

Université de Montréal

**Modulation du développement du cancer de l'intestin et du côlon par des  
nutriments des produits laitiers**

par

Marie-Josée Roy

Département de nutrition

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du  
grade de Maître ès sciences (M.Sc.)  
avec mémoire

Août, 2003

© Marie-Josée Roy, 2003



QU

145

U58

2004

V.014

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

## **IDENTIFICATION DU JURY**

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Modulation du développement du cancer de l'intestin et du côlon par des  
nutriments des produits laitiers**

Présenté  
par Marie-Josée Roy

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Michèle Houde-Nadeau	Président du jury
Dr Ernest G. Seidman	Directeur de recherche
Dr Marc Prentki	Membre du jury

## **SOMMAIRE**

Diverses études épidémiologiques ont suggéré que les composants lipidiques des produits laitiers tels le butyrate, jouent un rôle bénéfique dans la prévention du cancer du côlon. De plus, la carnitine, un acide aminé présent dans le lait, peut se conjuguer avec le butyrate afin d'augmenter sa demi-vie, sa biodisponibilité cellulaire ainsi que ses propriétés anticancéreuses. L'hypothèse selon laquelle le butyrate et la carnitine pourraient inhiber le développement du cancer du côlon in vitro et in vivo, a été testée. De plus, les mécanismes moléculaires par lesquels ces composés agissent in vitro, ont été examinés. Les effets antiprolifératifs du butyrate et de la carnitine ont été mesurés dans les cellules Caco-2, une lignée cellulaire bien établie, par l'incorporation de la thymidine radioactive. L'induction de l'apoptose a été quantifiée à l'aide de la cytométrie en flux et les caractéristiques morphologiques typiques de l'apoptose ont ensuite été confirmées dans les cellules Caco-2 traitées. L'augmentation de l'expression des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak et la diminution dans l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-x et de l'enzyme cyclooxygénase-2 (COX-2) chez les cellules Caco-2, ont été déterminées par la méthode de Western. Pour les expériences in vivo, un modèle de cancer expérimental (souris AOM) et un modèle génétique (souris Min) ont été utilisés. Les souris ont été divisées en des groupes diététiques différents selon leur contenu en butyrate et en carnitine. Après une exposition déterminée aux différentes diètes, les souris ont été sacrifiées, puis leurs intestins et leurs côlons ont été prélevés afin d'analyser les lésions cancéreuses. De plus, l'activité de la carnitine acétyltransférase et les profils en acylcarnitine ont été déterminés. Les résultats ont permis de conclure que la supplémentation en carnitine des diètes riches en butyrate inhibe le développement des lésions cancéreuses microscopiques et macroscopiques et augmente la biodisponibilité du butyrate. L'ensemble de notre étude confirme le rôle préventif et anticancéreux de ces deux nutriments des produits laitiers sur le cancer du côlon et de l'intestin.

**Mots clés :** Butyrate, carnitine, cancer du côlon, cellules Caco-2, prolifération, apoptose, expression des protéines, azoxyméthane, souris Min.

## **ABSTRACT**

Epidemiological studies have suggested a beneficial effect of the consumption of milk fat products as butyrate on colon cancer. Indeed, carnitine, an amino acid present in milk, can be conjugated with butyrate to enhance its half-life, its intracellular availability and in the same time its anticarcinogenic activity. In the present study, we have tested the effects of butyrate and carnitine on the development of colon cancer. The molecular mechanism by which these nutrients may inhibit colon cancer was also examined. Two mice models were used to test hypothesis. For in vitro studies, the Caco-2 human colon cancer cell line was used. Cell proliferation was measured using the  $^3\text{H}$ -thymidine method on Caco-2. Apoptosis was quantified by flow cytometry and with a commercial kit. Our observations show that these two milk components decreased proliferation and induced apoptosis of Caco-2 cells. Our experiments also demonstrate that  $\text{PGE}_2$  production was decreased in the treated cells. The molecular mechanism was verified by Western blotting and our experiments demonstrate that Bax and Bak, pro-apoptotic proteins, were increased whereas expression of Bcl-x, an anti-apoptotic protein, and COX-2 (cyclooxygenase-2) were decreased in the treated cells. Two mice models were used in vivo, a chemical carcinogen model (AOM) and a genetic model (Min). These mice were divided into groups of diet containing butyrate and carnitine. After diet exposure, mice were sacrificed and their colons and intestines were analyzed for cancerous lesions. Colonic carnitine acetyltransferase activity and acylcarnitine profiles were also measured. Our data indicate that carnitine supplementation decrease the development of cancerous lesions and increase bioavailability of butyrate. In conclusion, these two nutrients have beneficial effects against colon and intestine cancers.

**Keywords:** Butyrate, carnitine, colon cancer, Caco-2 cells, proliferation, apoptosis, protein expression, azoxymethane, Min mouse.



## **TABLE DES MATIÈRES**

Page de titre .....	i
Page d'identification du jury .....	ii
Sommaire .....	iii
Abstract .....	v
Table des matières .....	vii
Liste des figures .....	ix
Liste des abréviations .....	x
Dédicace .....	xii
Remerciements .....	xiii
<b>I. Introduction .....</b>	<b>1</b>
1.0 <u>Épidémiologie du cancer du côlon</u> .....	1
2.0 <u>L'alimentation et le cancer du côlon</u> .....	2
2.1 Rôle du gras animal et de la viande rouge .....	2
2.2 Rôle de l'obésité et de l'énergie .....	4
2.3 Rôle de l'alcool .....	5
2.4 Rôle du sucre .....	5
2.5 Rôle du café et du thé .....	6
2.6 Rôle des fibres .....	6
2.7 Rôle des fruits et des légumes .....	8
2.8 Rôle des antioxydants .....	9
2.9 Rôle de l'acide folique .....	10
3.0 <u>Les composantes des produits laitiers et le cancer du côlon</u> .....	11
3.1 Rôle du calcium .....	11
3.2 Rôle de la vitamine D .....	12
3.3 Rôle de l'acide linoléique .....	12

3.4 Rôle de la sphingomyéline .....	13
3.5 Rôle des probiotiques.....	14
3.6 Rôle des acides gras.....	15
3.7 Rôle de la carnitine.....	20
 4.0 <u>La biologie cellulaire et moléculaire</u> .....	23
4.1 Le processus de développement du cancer.....	23
4.2 La prolifération cellulaire.....	26
4.3 L'apoptose cellulaire.....	28
4.4 Les mécanismes moléculaires .....	29
4.4.1 Le gène p53.....	29
4.4.2 La cyclooxygénase-2.....	31
4.4.3 La famille des protéines Bcl-2.....	33
 5.0 <u>Stratégies dans la prévention primaire du cancer du côlon</u> .....	34
 <b>II. Description du projet de recherche</b> .....	36
1.0 <u>Hypothèses et objectifs</u> .....	36
2.0 <u>Le modèle in vitro</u> .....	36
3.0 <u>Les modèles in vivo</u> .....	36
3.1 Le modèle AOM .....	37
3.2 Le modèle Min.....	38
4.0 <u>Articles</u> .....	41
Mechanistics studies on the prevention of colon cancer by milk products	
Inhibition of intestinal and colon cancer development by carnitne and butyrate	
 <b>III. Discussion</b> .....	103
 <b>IV. Références</b> .....	115

## **LISTES DES FIGURES**

<b>Figure 1 :</b>	Mécanismes d'absorption des AGCC	p. 19
<b>Figure 2 :</b>	Métabolisme des acides gras modulé par la carnitine	p. 22
<b>Figure 3 :</b>	Cryptes aberrantes et adénocarcinomes	p. 24
<b>Figure 4 :</b>	Les étapes du développement du cancer	p. 26
<b>Figure 5 :</b>	Le cycle cellulaire	p. 27
<b>Figure 6 :</b>	Les événements apoptotiques	p. 29
<b>Figure 7 :</b>	Biosynthèse des prostaglandines	p. 33
<b>Figure 8 :</b>	Schéma résumé de la prévention	p. 35
<b>Figure 9 :</b>	Modèle de la mutation du gène APC	p. 40

## **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

AA :	Acide arachidonique
ACF :	« Aberrant crypt foci »
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AGCC :	Acide gras à chaîne courte
ALC	Acide linoléique conjugué
AMP :	Adénosine monophosphate
AOM :	Azoxyméthane
APAF-1 :	« Apoptosis protease- activating factor-1 »
APC :	« Adenomatous polyposis coil protein »
ATP :	Adénosine triphosphate
BAL :	Bactéries à acide lactique
CAT :	Carnitine acétyltransférase
Cdk :	« Cycline dependant kinase »
CEA :	« Carcinoembryonic antigen »
COX-2 :	Cyclooxygénase-2
CPT :	Palmitoyltransférase
FBS :	« Foetal bovine serum »
IGF-1:	« Insulin growth factor-1 »
IMC :	Indice de masse corporelle
kg :	Kilogramme
MEM :	« Minimum essential medium »
Min :	« Multiple intestinal neoplasia »
MPF :	« Mitose promotor factor »
M :	Molaire
ml :	Millilitre
mM :	Millimolaire
NF $\kappa$ B :	« Nuclear factor kappa-B »
NK :	« Natural killer cells »
nmol :	Nanomolle

OCTN-2 :	« Organic cation/carnitine transportor »
PARP :	« Peroxisome proliferator-activator receptor »
PI :	« Propidium iodide »
PGs :	Prostaglandines
pRb :	« Retinoblastoma protein »
SM :	Sphingomyéline
TBST :	« Tris-buffered saline/Tweed 20 »
Tcf-4 :	« T-cell factor-4 »
TNF- $\alpha$ :	« Tumor necrosis factor-alpha »
VEGF :	« Vascular endothelial growth factor »
UI :	Unité internationale
$\mu$ Ci :	Microcurie
$\mu$ M :	Micromolaire
$\mu$ mol :	Micromolle

**À tous ceux que j'aime ...**

## **REMERCIEMENTS**

Je voudrais remercier mon directeur de recherche, le Dr Seidman pour son soutien académique et pour la grande confiance qu'il a eue en moi tout au long de ma maîtrise. Je le remercie également pour les connaissances qu'il a su me transmettre.

Je désire également remercier Denise Lévesque, Serge Dionne et Sandra Bernotti de m'avoir enseigné les techniques de laboratoire et de m'avoir transmis les connaissances scientifiques nécessaires au bon déroulement de ma recherche. Je tiens aussi à remercier Sylvie Marineau pour son aide et son assistance de bureau. Un immense merci à vous tous, pour la disponibilité et le grand dévouement que vous avez eus à mon égard.

Je remercie également tous les gens du laboratoire pour leur accueil chaleureux, leur appui constant et leur immense gentillesse. J'ai vraiment passé de très beaux moments en votre compagnie.

Un remerciement sincère à ma famille et à mes amis qui m'ont toujours soutenue et encouragée dans mes projets.

Enfin, je désire remercier Nicolas, pour son amour constant, son soutien et sa compréhension.

## **INTRODUCTION**

### **1.0) Épidémiologie du cancer du côlon**

Le cancer du côlon est la seconde cause de mortalité due à un cancer dans les pays industrialisés après le cancer du poumon chez l'homme (1). Chez les femmes, ce cancer se retrouve au troisième rang de la mortalité après celui du poumon et du sein (2). De plus, les statistiques nous montrent que 6 % de la population américaine développera un cancer du côlon au cours de sa vie. C'est pourquoi le cancer du côlon est l'un des diagnostics les plus répandus et était la cause en 1998 de 47 000 décès aux États-Unis (3). La situation devient encore plus dramatique en 2000, où on a rapporté quelques 130 000 nouveaux cas de cancer du côlon et 56 000 décès en ont découlé (4). Au Canada, on compte 6300 décès et 16 600 nouveaux cas en 1999 (5). Ainsi, nous sommes loin d'avoir gagné la lutte contre le cancer, puisque malgré de nombreux efforts depuis le début des années 1970, le National Cancer Institut n'a pas atteint son but de réduire de 50 % la mortalité pour l'année 2000.

Le développement de plusieurs cancers dont celui du côlon est intimement relié à des facteurs environnementaux et à certains impératifs du milieu tels que l'alimentation. En effet, dans le cas du cancer du côlon, on considère que 90 % des cas sont la conséquence d'une alimentation inappropriée (1) alors que le 10 % restant serait d'étiologie génétique (6). Les facteurs environnementaux influencent beaucoup la prévalence et l'incidence de cancer du côlon; c'est la raison qui explique que les taux changent considérablement d'une population à l'autre. C'est également la raison expliquant une augmentation de l'incidence de ce cancer dans la population japonaise immigrée aux États-Unis (7).

De plus, l'épidémiologie a recensé les plus hauts taux d'incidence du cancer du côlon aux États-Unis, au Canada et en Nouvelle-Zélande et les plus bas en Asie, en Afrique et en Amérique Latine. Plus spécifiquement au Canada, c'est à



Terre-Neuve que l'on retrouve le plus haut taux de cancer du côlon, mais la province de Québec ne suit pas très loin derrière. Il est donc clair que le cancer du côlon est une maladie propre aux pays développés, car on dénombre dans ces pays deux fois plus de nouveaux cas diagnostiqués en 2000 en comparaison avec les pays en voie de développement (8).

De nombreuses études épidémiologiques ont été faites sur le sujet et elles ont permis de définir le profil typique d'une diète protectrice contre le cancer du côlon. Plus particulièrement, cette diète se résume comme étant faible en gras animal, modérée en calories, mais riche en fruits, légumes et fibres (9,10). À l'opposé, une diète de style occidentale, c'est-à-dire riche en viande rouge, en gras animal, et faible en fibres, augmente les risques d'être atteint du cancer du côlon (11,12). Bien que l'on connaisse les principes généraux d'une diète protectrice, il reste toutefois bien des doutes qu'en aux composantes particulières qui confèrent à ces aliments (fruits, légumes, fibres) leurs propriétés anticancérigènes. En effet, on se demande s'il s'agit des vitamines, des minéraux ou des autres composés phytochimiques présents dans ces aliments.

## **2.0) L'alimentation et le cancer du côlon**

### **2.1) Rôle du gras animal et de la viande rouge**

Tel que mentionnée ci-haut, les très nombreuses études épidémiologiques ont déjà démontré l'influence de l'alimentation sur l'incidence du cancer du côlon. En effet, nous retrouvons dans notre diète des facteurs nutritionnels ayant des effets protecteurs et d'autres dotés d'effets provocateurs ou incitateurs du cancer.

L'hypothèse selon laquelle la viande rouge et le gras saturé animal augmentent les risques du cancer du côlon est solidement fondée et a été observée à plusieurs reprises. En effet, une étude prospective a fournit

l'évidence que le gras animal augmente le risque de cancer du côlon chez des sujets humains (13). De plus, Hursting et al ont observé une corrélation positive entre le risque de cancer du côlon et la consommation de gras saturé (14). Une autre étude, cette fois de cohorte, effectuée auprès d'une population d'américains a également prouvé que la consommation de viande rouge est reliée à un risque accru de ce type de cancer (9). La littérature sur le sujet rapporte au moins 41 études épidémiologiques sur l'association entre la viande et le cancer de côlon, ainsi 24 études ont trouvé une association positive et une seule a conclu une association inverse, les 16 autres études n'ayant pu démontrer clairement une association significative (1,7,9,10,13,15,16,17).

Concernant la relation entre le gras et le côlon, la littérature (1,15,17,18,19) a montré que sur 25 études faites à ce sujet, 10 ont trouvé une corrélation positive et une seule a démontré une relation inverse, les 14 autres études n'ayant pas pu montrer une association significative (1,15,17,18,19). Ces 25 études faisant davantage référence au gras animal saturé provenant de la viande rouge. De plus, l'une de ces études a indiqué une association inverse entre le ratio de gras polyinsaturés/saturés et le cancer du côlon suggérant que ce ratio est un meilleur indicateur du risque du cancer du côlon comparativement à la quantité totale de gras dans la diète (19).

Également, le type de viande, son type de gras et son mode de cuisson jouent des rôles prépondérants dans le risque de cancer du côlon puisque le bœuf, l'agneau, le porc, les abats et les charcuteries sont tous associés positivement avec une élévation du risque du cancer du côlon (9,13,16). Cependant, des études épidémiologiques et cliniques ont prouvé une association inverse entre le risque du cancer colorectal et des sources de gras d'origine animale autres que la viande rouge comme le gras des produits laitiers, du poulet, du poisson et des fruits de mer (9,20). En ce qui concerne le temps de cuisson, il s'avère être un autre facteur important, car il a été observé que la cuisson des aliments à température élevée augmente le risque de cancer et ce, en libérant une quantité importante d'éléments carcinogènes i.e.

les amines hétérocycliques (21). Les viandes fumées contiennent également une quantité non-négligeable d'agents carcinogènes, tels que les nitrites (21).

Plusieurs autres investigations ont été faites sur d'autres types de gras afin de déterminer leurs effets sur le cancer du côlon. Ainsi, une étude a montré qu'une consommation élevée en acide butyrique, en acide  $\alpha$ -linoléique, tous deux présents dans le gras laitier, et en acide gras oméga-3, présent dans le gras de poisson, permettent de réduire le risque du cancer du côlon. Toutefois, l'acide arachidonique et un ratio élevé en gras polyinsaturés oméga-6/oméga-3 augmentent les risques (22).

Les mécanismes par lesquels une consommation élevée en gras et en viande augmente le risque du cancer du côlon sont de différentes natures et sont hypothétiques. Tout d'abord, le gras de la viande rouge agit comme promoteur du cancer en augmentant la production d'acides biliaires, créant alors des dommages à l'ADN et aux cellules colorectales. Un second mécanisme étudié est l'élévation des dommages cytotoxiques en raison du fer présent dans la viande rouge qui catalyse les réactions d'oxydation. De plus, on a déjà mentionné que la viande cuite à haute température libère des amines, composés cancérigènes (15).

## 2.2 Rôle de l'obésité et de l'énergie

Comme nous le savons, une alimentation riche en gras saturés entraîne également une augmentation des calories ingérées et par le fait même augmente les risques de souffrir d'obésité. Vu leurs connexions, ces deux derniers éléments ont donc été étudiés comme des facteurs influençant l'incidence du cancer du côlon et ce depuis longtemps puisqu'il y a de cela 50 ans, une étude pionnière de Tannenbaum et Silvertone (23) indiquait qu'une restriction calorique réduisait la formation de tumeurs chez les souris. De plus, plusieurs études cas-témoins ont clairement démontré que les sujets avec un indice de masse corporelle (IMC) et une consommation énergétique plus

élevés, ont un risque de cancer colorectal plus important. (7,11,12,24). Une étude in vivo, a aussi démontré que les animaux nourris par une diète restreinte de 30 % en calories développent moins de tumeurs colorectales que les animaux nourris ad libitum (25,26).

Les mécanismes d'action par lesquels une consommation importante en énergie et un IMC élevé augmentent l'incidence du cancer du côlon sont surtout reliés au fait que ces deux conditions entraînent éventuellement une résistance à l'insuline et une hyperinsulinémie, eux-mêmes impliquées dans la carcinogenèse du côlon (7,17). En effet, une étude de cohorte auprès des Adventistes a démontré que l'hyperinsulinémie est en relation directe avec une incidence élevée du cancer du côlon puisque l'insuline a pour effet de se lier et d'activer sur les cellules, les récepteurs IGF-1 (insulin growth factor), promoteurs du cancer. Plusieurs autres études cas-témoins sont arrivées aux mêmes conclusions que l'étude effectuée auprès des Adventistes. (27,28).

### 2.3) Rôle de l'alcool

Une grande consommation d'alcool semble aussi être associée à un risque élevé de cancer du côlon et du rectum (29). Il semblerait que la bière ait une association un peu plus forte avec le cancer que le vin et les spiritueux. (30). En effet, l'alcool tient son association positive avec le cancer du côlon en interférant avec la biodisponibilité de l'acide folique. De plus, l'éthanol agit directement sur la flore intestinale en produisant des métabolites cancérigènes tels que l'acétaldéhyde. Ces derniers ont pour effet de dérégler la flore et d'endommager les colonocytes.

### 2.4) Rôle du sucre

Un autre des éléments abondamment retrouvés dans la diète occidentale est impliqué dans l'incidence du cancer du côlon, c'est-à-dire la consommation importante en sucre. Une méta-analyse a recensé que sur 17 études

épidémiologiques faites sur le sujet, 15 ont rapporté une association positive entre le sucrose et le risque du cancer du côlon, toutefois, seulement la moitié d'entre elles sont statistiquement significatives (17). Bien que plusieurs investigations aient été faites afin de trouver un aliment individuel ou un groupe d'aliments riches en sucrose contribuant davantage au développement du cancer du côlon, il est encore aujourd'hui difficile d'en isoler un plus que les autres.

Les mécanismes impliqués dans cette association sont multiples et complexes. Ils peuvent se résumer par la formation des composés génotoxiques une fois le sucre cuit, l'augmentation du temps de transit au niveau du côlon, l'augmentation de la concentration d'acides biliaires, de la prolifération cellulaire, du nombre de cryptes aberrantes et bien entendu, l'hyperinsulinémie (15).

#### 2.5) Rôle du café et du thé

Selon certaines études, le café contient également des substances mutagènes impliquées dans certains types de cancer (32), toutefois, il ne semble pas évident que le café soit significativement associé avec le risque de cancer colorectal (33). Bien au contraire, des études récentes ont démontré que le café, le thé vert et le thé blanc ont des propriétés antioxydantes, ce qui protégeraient les grands consommateurs de ces boissons contre le cancer du côlon (34) et cette protection est encore plus significative chez l'homme par rapport à la femme (35).

#### 2.6) Rôle des fibres

L'hypothèse selon laquelle les fibres diminuent le risque du cancer colorectal est l'une des plus anciennement étudiée et des plus solidement fondée. De très nombreuses études épidémiologiques ont déterminé l'effet protecteur des fibres alimentaires au niveau du cancer du côlon (9,12,13,36).

Toutefois, des études ont également conclu que les types de fibres n'ont pas tous les mêmes effets bénéfiques comme par exemple, les polysaccharides versus les non-polysaccharides, les solubles versus les insolubles, les fermentescibles versus les non-fermentescibles, les fibres céréalières versus celles des végétaux. (37). Plus précisément, la cellulose et le blé entier contribuent à diminuer la concentration des acides biliaires, alors que l'avoine et le maïs l'augmentent. Les fibres insolubles diminuent efficacement le transit intestinal alors que les fibres solubles ont beaucoup moins d'effets à cet égard. Ces diverses actions selon la classification des fibres peuvent expliquer en partie les résultats contradictoires de trois études de cohorte (15,38) qui n'ont pu prouver l'effet protecteur des fibres sur le cancer du côlon. Néanmoins, l'hypothèse générale de protection des fibres reste bien établie. En effet, une méta-analyse a recensé que sur 19 études cas-témoins investiguant le lien entre la consommation des fibres et le cancer du côlon, huit études ont montré une protection élevée, cinq études ont démontré une protection modérée, quatre ont conclu un effet nul et seulement deux études ont identifié un effet promoteur des fibres sur le cancer (15,17). Une autre méta-analyse regroupant cette fois-ci 13 études cas-témoins, a unanimement démontré une association inverse statistiquement significative entre la quantité de fibres consommées et le risque de cancer du côlon (36).

Les mécanismes par lesquels les fibres jouent leurs rôles protecteurs sont nombreux (37). On a suggéré, tout d'abord, une dilution des substances fécales mutagènes ainsi qu'une diminution de la concentration des acides biliaires et des carcinogènes en raison de l'augmentation du bol fécal. On a également soumis l'hypothèse d'une diminution du temps du transit intestinal, donc un temps de contact moindre entre la muqueuse et les substances carcinogènes. Les fibres permettent aussi la production d'acides gras à chaîne courte tel le butyrate ayant un potentiel anticancérigène. Autre mécanisme, les fibres entraînent la diminution du pH, en réduisant la solubilité des acides biliaires et en réduisant la conversion des acides biliaires primaires en secondaires. De plus, les fibres altèrent positivement la flore bactérienne et préviennent la

résistance à l'insuline. Il est important de mentionner que ces mécanismes énumérés reflètent un tableau général d'action des fibres et que d'autres mécanismes sont présentement sous investigation (37).

### 2.7) Rôle des fruits et légumes

En plus des fibres alimentaires retrouvées dans les fruits et les légumes, ces derniers contiennent une multitude de composés potentiellement anticancérigènes et ils sont pour ainsi dire les aliments les plus constamment associés à une réduction du risque de cancer du côlon (17,39,40). Ces composés anticancérigènes les mieux connus sont les antioxydants, les vitamines, les enzymes et l'acide folique (37). Cependant, des études plus récentes discutent de d'autres composés protecteurs tels que les dithiolthiones, les glucosinolates, les caroténoïdes, les phytoestrogènes, les thiocyanates, les flavonoïdes, les phénols, les stérols, les isoflavones et plusieurs autres (37).

Les études épidémiologiques sur le sujet offrent des résultats très similaires et positifs. En effet, sur 31 études épidémiologiques investiguant sur cette association, 29 études ont démontré une association inverse (15,17,39) entre la consommation de fruits et de légumes et le risque de cancer du côlon. Toutefois, l'association est davantage significative avec les légumes comparativement aux fruits. De plus, il existe au sein des légumes, des sous-groupes ayant des propriétés protectrices accrues comparativement aux autres. Ainsi, une étude a montré que la famille des crucifères (brocoli, chou-fleur) a davantage d'effets bénéfiques dus à la quantité importante de l'antioxydant l'indole-3-carbinol, retrouvé dans ces légumes (40).

Les nombreux composés anticancéreux retrouvés dans les fruits et les légumes présentent une multitude de mécanismes d'action complémentaires tels que l'induction d'enzymes détoxifiantes, l'inhibition de la formation de nitrosamine, la formation d'agents antinéoplasiques, la dilution d'agents

cancérigènes, l'altération positive du métabolisme hormonal, l'antioxydation et bien d'autres (37).

## 2.8) Rôle des antioxydants

Bien que le calcium et la vitamine D soient considérés par plusieurs comme ayant des effets protecteurs importants, d'autres vitamines partagent aussi ces propriétés anticancérigènes, mais s'inscrivent dans la catégorie des vitamines antioxydantes. En effet, il a déjà été démontré que les agents oxydants sont des promoteurs du développement du cancer, car ils créent des dommages à l'ADN des cellules corporelles et en particulier les colonocytes. Les micronutriments tels la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes présentent des effets antioxydants directs, alors que d'autres nutriments tels le sélénium, la riboflavine, la niacine, le zinc et le manganèse sont plutôt des composantes essentielles des enzymes antioxydantes (41). Tous ces micronutriments antioxydants ont des mécanismes d'action quelque peu différents, mais généralement ils permettent de protéger la membrane cellulaire et l'ADN des dommages oxydatifs, en plus de réduire de façon considérable la formation des nitrites. Plus spécifiquement, les vitamines C, E, les caroténoïdes et le sélénium peuvent stimuler le système immunitaire et exercer une surveillance immunitaire accrue. De plus, le  $\beta$ -carotène et le sélénium peuvent aussi inhiber la prolifération cellulaire et ce, indépendamment de leurs capacités antioxydantes (41). Aussi, il a été démontré dans des études *in vivo*, que les vitamines E, C et  $\beta$ -carotène réduisent la formation de tumeurs colorectales chez les animaux (24). Les études épidémiologiques de type cas-témoins et de cohorte sur l'association entre la vitamine E seulement et le risque du cancer colorectal sont quelque peu mitigées, toutefois les études prospectives ont bien montré une association inverse. En effet, cinq études prospectives ont conclu que le niveau d' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E) est plus bas chez les sujets ayant développé subséquemment le cancer colorectal (42). En ce qui concerne, les caroténoïdes (la  $\beta$ -carotène et le rétinol), les études épidémiologiques sont assez controversées et il est difficile de trouver un consensus, quoi qu'il n'y ait



guère plus de consensus pour la vitamine C (15). Pour ce qui est du sélénium, une consommation élevée a permis de réduire les risques du cancer dans une étude in vivo (43). Cependant, dans les études épidémiologiques cas-témoins et de cohorte, les niveaux de sélénium sanguin n'ont pas été mis en relation avec une incidence moindre de cancer (44). Concernant, la riboflavine, la niacine, le zinc et le manganèse, quelques études épidémiologiques confirment leurs effets protecteurs, toutefois assez peu d'investigations ont été faites sur le sujet (24). Pour ce qui est des études d'intervention, quelques études ont démontré une certaine efficacité des antioxydants dans la réduction de l'incidence du cancer toutefois, bien peu en ce qui concerne spécifiquement le cancer du côlon (24).

### 2.9) Rôle de l'acide folique

L'acide folique est un autre élément qui intéresse grandement les chercheurs pour ces propriétés anticancérigènes. Il agit comme protecteur puisqu'une déficience dans la diète en acide folique et en méthionine peut causer une hypométhylation de l'ADN qui est une étape cruciale dans le développement du cancer. Une consommation accrue en alcool combinée à une diète faible en vitamine B6 et B12 peut entraîner une hypométhylation encore plus importante (45). À l'opposé, une consommation élevée en acide folique et en méthionine, ainsi qu'une faible consommation en alcool permettent de réduire entre 35 % et 80 % le risque de développer un cancer du côlon (46). Ainsi, la plupart des études épidémiologiques faites sur le sujet ont trouvé une association inverse entre le folate sanguin et un risque de cancer colorectal (46).

### **3.0) Les composantes des produits laitiers et le cancer du côlon**

La consommation de produits laitiers a été dans de nombreuses études épidémiologiques associée à une diminution de l'incidence du cancer du côlon (47). Ces propriétés anticancérigènes sont dues à plusieurs composantes telles que l'acide linoléique, la sphingomyéline, le butyrate, la carnitine, mais aussi le calcium, la vitamine D et les probiotiques.

#### **3.1) Rôle du calcium**

Le calcium a également été étudié par plusieurs chercheurs pour ses propriétés anticancérigènes. En effet, il a été prouvé que l'incidence du cancer du côlon est inversement proportionnelle à la consommation de calcium et que la plupart des cas de cancer du côlon pourraient être prévenus par une consommation quotidienne en calcium de 1800 mg/jour (48,49). En fait, une consommation adéquate en calcium permet à ce dernier de former un complexe avec les acides biliaires libres afin que leurs effets mutagènes et cytotoxiques deviennent inactifs. De cette façon, ils perdent leurs effets nocifs sur l'épithélium intestinal et colorectal (48).

De plus, il a été démontré que le calcium réduit la prolifération des colonocytes cancéreux, induit la différenciation et l'apoptose cellulaire (50). Toutefois, les mécanismes par lesquels le calcium affecte le cycle cellulaire de croissance sont encore sous investigation, bien que certaines hypothèses semblent davantage vraisemblables telles que l'interaction du calcium avec l'AMP-cyclique et la tyrosine kinase, ainsi que l'adhésion du calcium à la E-cadhérine. De plus, le calcium provoque une réduction de la cytotoxicité au niveau du côlon (49).

En général, les études épidémiologiques rapportent des associations inverses entre le calcium et le cancer du côlon, à quelques exceptions près. En effet, sur 23 études épidémiologiques (cas-témoins et cohorte), 17 ont trouvé

une association inverse (15,17) et seulement trois études ont conclu à une association positive. Toutefois, ces trois dernières ne sont pas statistiquement significatives. D'autres études in vivo, faites auprès de rongeurs, ont aussi montré que la consommation de calcium prévient l'hyperprolifération et l'hyperplasie des tissus coliques cancéreux de ces animaux (50). Des résultats très similaires ont été démontrés par la suite dans plusieurs études cliniques effectuées aux États-Unis, puisqu'une supplémentation en calcium entraîne une réduction statistiquement significative de 20 % du nombre d'adénomes chez des sujets humains (50,51).

### 3.2) Rôle de la vitamine D

Les aliments où l'on retrouve le plus de calcium sont bien entendu les produits laitiers, car près de 90 % de la source de calcium provient du lait fortifié en vitamine D (48). Ainsi, la vitamine D joue également un rôle protecteur contre le cancer et les résultats des études suggèrent qu'une consommation de 800 UI/jour de vitamine D permet de réduire l'incidence du cancer du côlon (48). De plus, la littérature fait mention de 12 études épidémiologiques sur la relation entre la vitamine D et le cancer du côlon et dix de celles-ci ont démontré une association inverse, alors qu'aucune a rapporté une association positive (52,53). Tout comme le calcium, la vitamine D agit comme un agent protecteur en diminuant la prolifération, en induisant la différenciation et l'apoptose des cellules transformées (11).

### 3.3) Rôle de l'acide linoléique

L'acide linoléique conjugué (ALC), est présent naturellement dans le lait et les autres produits laitiers. Les effets bénéfiques de l'ALC ont été nettement étudiés, une de ces études a démontré que l'ALC inhibe le développement des tumeurs épidermiques dans un modèle in vivo (54). En 1995, Liew et al (55) ont aussi montré que l'ALC diminue la formation des cryptes aberrantes au niveau du côlon et leur développement vers des tumeurs. Les mécanismes par

lesquels l'ALC joue son rôle protecteur ne sont pas totalement connus et semblent varier selon l'âge de la tumeur, son site et la durée d'exposition des cellules avec l'acide linoléique conjugué (47).

Néanmoins, plusieurs études ont suggéré que cet acide gras agit en tant qu'antioxydant (54), qu'inhibiteur de l'activation des carcinogènes (56), de la synthèse de l'ADN (56) des nucléotides (57), et de la prolifération (55). On a de plus prouvé que l'effet inhibiteur de l'ALC sur la prolifération est en fait dû au blocage du cycle cellulaire à la phase G0/G1 (55). L'acide linoléique conjugué peut aussi réduire la synthèse des prostaglandines, en remplaçant l'acide arachidonique des membranes cellulaires, le précurseur des prostaglandines. Il a été en effet montré dans une étude in vivo que les souris nourries par une diète riche en ALC produisent significativement moins de prostaglandines (58).

### 3.4) Rôle de la sphingomyéline

La sphingomyéline (SM) est un phospholipide localisé dans la membrane plasmique des cellules des mammifères. La SM représente le 1/3 des phospholipides totaux retrouvés dans le lait de vache. Ce composé est fait de deux métabolites actifs soit la céramide et la sphingosine, tous deux importants pour le signal de transduction et de régulation cellulaire (47). Les buts de ces métabolites sont l'activation de certains facteurs de transcription tels le NF $\kappa$ B, participant au contrôle de la prolifération cellulaire, l'inhibition de la protéine kinase, l'activation du gène pRb suppressif des tumeurs, la régulation du cycle cellulaire et la diminution de l'expression du gène c-myc proto-oncogène. La sphingomyéline permet donc d'inhiber la prolifération, d'induire la différenciation et l'apoptose des cellules cancéreuses (59,60). Dans une étude in vivo, Dillehay et al (61) ont constaté que les souris nourries par une diète supplémentée en SM ont une incidence des tumeurs du côlon moindre de 27 % comparativement au groupe contrôle. De plus, Schmelz et al (62) ont trouvé une réduction de 70 % du nombre de cryptes aberrantes colorectales chez les souris supplémentées avec de la sphingomyéline.

### 3.5) Rôle des probiotiques

L'intérêt pour les probiotiques présents dans les produits laitiers, en particulier les bactéries à acide lactique (BAL), est assez récent. Toutefois, de plus en plus d'études d'envergure s'intéressent à ce sujet (63) puisque les effets de ces bactéries sont très surprenants. Les probiotiques sont des microorganismes non-pathogènes qui une fois ingérés exercent une influence bénéfique pour la santé (64). Plusieurs études ont déjà démontré l'effet protecteur de ces bactéries contre le développement des tumeurs (65). Cet effet de retardement du développement est en fait dû à l'influence métabolique et immunologique des BAL dans le côlon (65). En effet, dans un modèle in vivo de cancer, on a constaté que l'ingestion des bactéries à acide lactique permet de prévenir le développement des lésions prénéoplasiques et des tumeurs chez les souris (64,66). Il n'y a pas toutefois d'évidence claire quant au fait que les BAL préviennent l'initiation du cancer du côlon chez l'homme, puisque les études épidémiologiques restent nébuleuses à ce sujet. En effet, quelques études ont démontré une incidence moindre de cancer colorectal chez les sujets humains consommant plus de produits laitiers (67), alors que d'autres n'ont strictement rien pu prouver (68). L'ensemble de la littérature scientifique nous fait remarquer que la majorité des évidences positives proviennent des études faites sur des modèles animaux et non pas sur des sujets humains. Alors, vu le manque d'études épidémiologiques, il est assez difficile de conclure à ce sujet. Pour ce qui est des mécanismes d'action de ces bactéries, ils sont peu connus, néanmoins, certaines hypothèses ont déjà été émises telles que l'altération des activités métaboliques de la flore intestinale, l'altération des conditions physico-chimiques du côlon, la liaison avec des agents carcinogènes pour les rendre inactifs, la production de composés antimutagènes et l'amélioration de la réponse immunitaire (69).

### 3.6) Rôle des acides gras

D'autres composés du lait grandement étudiés pour leurs propriétés anticancérigènes sont les acides gras à chaîne courte et plus particulièrement le butyrate présent dans le lait. En fait, le lait de vache contient de 7.5 à 13.0 mol/100 mol d'acide butyrique (47). Le butyrate (acide gras à 4 carbones) est aussi l'un des trois acides gras à chaîne courte (AGCC) retrouvé dans le côlon, les deux autres étant le propionate et l'acétate. Ces trois AGCC sont très importants pour le métabolisme des colonocytes puisqu'ils forment 80 % de l'ensemble des AGCC présents dans le côlon (70).

Le butyrate est produit dans le côlon par la fermentation bactérienne des fibres alimentaires et des protéines. De plus, c'est le butyrate qui fournit la principale source d'énergie pour le métabolisme des colonocytes, car plus de 70 % de l'énergie utilisée par les cellules provient de l'oxydation du butyrate, de façon préférentielle aux autres acides gras. Chez l'homme, le butyrate est rapidement absorbé par la muqueuse du côlon soit l'équivalent de 95 % à 99 % du butyrate total produit et c'est une fois absorbé, qu'il peut jouer ses rôles physiologiques (70). Les mécanismes impliqués dans le transport des AGCC dont le butyrate, sont dose-dépendants et incluent différents procédés transcellulaires. Les études sur le sujet ont montré la présence d'une diffusion non-ionique couplé à un échange  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , comme étant le principal moyen de transport (71,72,73). D'autres études ont en plus suggéré la présence d'une diffusion ionique où les AGCC sont transportés par un échange avec les anions de bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ) (74). Finalement, l'absorption des AGCC pourrait également s'expliquer par la diffusion ionique à travers un mécanisme paracellulaire (71). (Voir figure 1, p.19)

En plus, d'être une source d'énergie considérable, le butyrate permet de maintenir l'intégrité et les fonctions normales de l'épithélium du côlon. Le butyrate est aussi reconnu comme un stimulant puissant de la prolifération des colonocytes immatures, situés à la base des cryptes (75). Ainsi, il a été

démontré depuis longtemps dans une étude *in vivo*, qu'une réduction de l'apport alimentaire en butyrate induit une atrophie marquée de la muqueuse colique chez le rat (76), toutefois le rétablissement par intraperfusion de butyrate dans le côlon permet de réparer la muqueuse lésée (77). Ce même phénomène a également été étudié un peu plus tard sur des côlons humains (78).

Au niveau moléculaire, le butyrate est impliqué à de très nombreux niveaux. Tout d'abord, le butyrate peut via son produit, le mévalonate, interagir avec les protéines G situées à l'interface de la membrane cellulaire et du cytoplasme. Ces protéines sont nécessaires pour la génération de seconds messagers qui par la suite activent les signaux cellulaires de transduction afin de stimuler la prolifération des colonocytes normaux (78). En effet, cette liaison est indispensable pour l'activation de la cascade ras, une voie classique de la transduction d'un signal stimulant la prolifération cellulaire (79). Toutefois, ce qui est le plus remarquable du butyrate, c'est qu'il est capable d'augmenter la prolifération des colonocytes normaux et paradoxalement inhibe la prolifération des cellules cancéreuses (75).

Néanmoins, les modifications nucléaires représentant les mécanismes d'action principaux du butyrate sur la transcription des gènes, sont l'hyperméthylation des résidus de cytosines de l'ADN et l'hyperacétylation des histones. L'hyperacétylation des histones est, en général, reliée à l'augmentation de l'expression des gènes (80) et à l'augmentation de la sensibilité de l'ADNase I (81) alors que l'hyperméthylation peut entraîner la diminution de l'expression des gènes. Le butyrate en interférant avec la transcription de gènes, inhibe et influence à la fois, l'expression de plusieurs proto-oncogènes c'est-à-dire le p53 mutant, le c-myc, le ras, le src, le c-fos et le c-jun (82,83,84,85), contribuant ainsi à son effet anticancérigène. De plus, l'inhibition sélective de la phosphorylation des histones H1 et H2 (86,87) et l'augmentation de la phosphorylation de l'histone H3 (88) représentent un autre mécanisme moléculaire par lequel le butyrate module l'expression des

protéines nucléaires. Le butyrate est également un puissant inhibiteur de l'urokinase dans les cellules cancéreuses, ce qui permet de réduire leur potentiel métastatique (74,75).

Cet AGCC agit également sur les cellules cancéreuses en arrêtant le cycle cellulaire à la phase G1-S. Plus précisément, les cellules stimulées avec le butyrate augmentent l'expression des protéines p21 et p27, deux inhibiteurs des cyclines dans le cycle cellulaire (89,90). L'inhibition de la prolifération par le butyrate serait également causée par une diminution de l'activité de p34<sup>cdc2</sup>, ayant pour effet d'arrêter le cycle cellulaire des cellules cancéreuses à la phase G2-M (91).

En plus de son action antiproliférative paradoxale, le butyrate est aussi connu comme un agent inducteur de la différenciation cellulaire (92). Les enzymes de la bordure en brosse, comme la phosphatase alcaline, sont des marqueurs de différenciation et leurs expressions diminuent avec les transformations néoplasiques (93,94). Toutefois, le butyrate entraîne l'augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline dans les cellules cancéreuses du côlon (84).

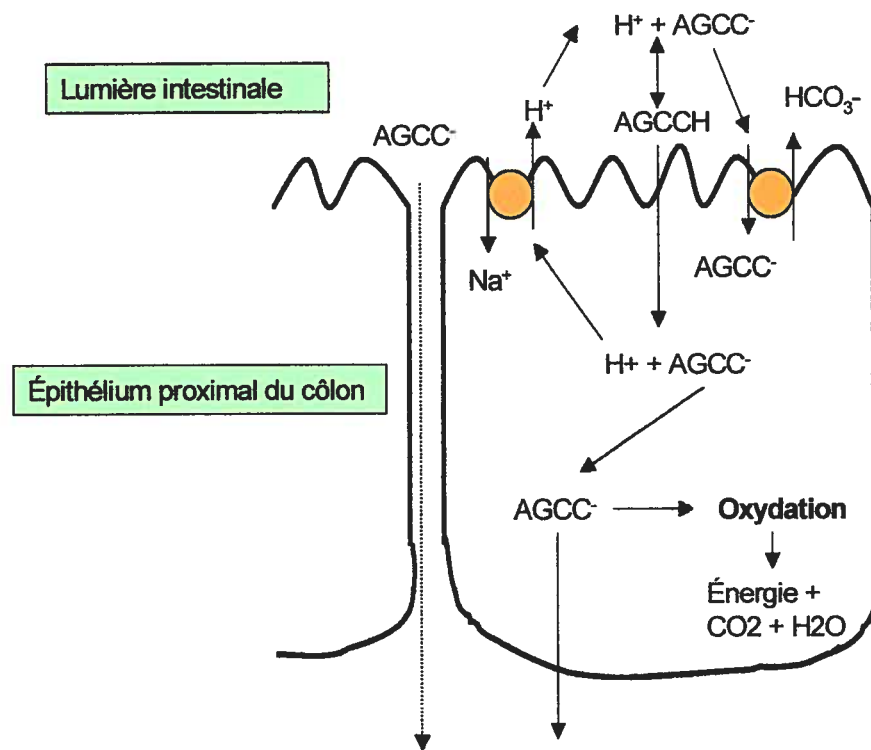
De plus, l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses par le butyrate, contrairement aux cellules normales, est un autre effet anticancéreux du butyrate. L'apoptose induite par le butyrate, en plus d'être précédée par l'induction de p21 et p27 (95), est aussi précédée d'une augmentation de l'expression des protéines pro-apoptotiques telles Bax et Bak, et d'une diminution de l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x (96,97). Lors de l'induction de l'apoptose par le butyrate dans les cellules cancéreuses, on remarque également une induction de la caspase-3, ce qui permet la dégradation de la protéine PARP (Peroxisome Proliferator-Activator Receptor) afin que survienne la mort cellulaire (98). Une étude récente a démontré un autre mécanisme d'apoptose selon lequel le butyrate augmente la sensibilité des cellules cancéreuses à l'apoptose médiée par le gène Fas (99).



Il a été de plus établi dans de nombreuses études in vitro que le butyrate diminue l'expression de l'enzyme COX-2 (cyclooxygénase-2) et subséquemment la production de PGE<sub>2</sub> (100). Cette enzyme oncogène et les prostaglandines sont retrouvées en quantité importante dans les cellules cancéreuses puisque le COX-2 régit la voie apoptotique des cellules cancéreuses et est l'enzyme clé de la production des PGE<sub>2</sub> à partir de l'acide arachidonique.

Une autre étude a démontré que les cellules cancéreuses traitées avec le butyrate ont une forte induction de l'antigène carcinoembryonique (CEA) (101). De plus, le butyrate permet d'augmenter l'activité du cytochrome oxydase puisqu'il se retrouve à un niveau anormalement bas dans les tumeurs du côlon (102). En plus de ces effets sur les oncogènes, des études ont identifié le butyrate comme un agent anti-inflammatoire et un inhibiteur des cytokines pro-inflammatoires en inactivant le facteur de transcription NFκB, d'où l'efficacité du butyrate dans les maladies inflammatoires (103,104).

**Figure 1 : Mécanismes d'absorption des AGCC**



Adapté de Velasquez et al. (71)

Figure 1: Modèle simplifié de l'absorption des AGCC par les cellules épithéliales du côlon. Les mécanismes proposés : 1) La diffusion passive de AGCCCH couplée à un échange  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . 2) Le transport de la forme ionique via un échange  $\text{AGCC}^-/\text{HCO}_3^-$ . 3) Le transport paracellulaire des  $\text{AGCC}^-$ .

### 3.7) Rôle de la carnitine

La L-carnitine est un acide-aminé non essentiel que l'on retrouve dans les aliments d'origine animale tels que la viande, le poisson, les produits laitiers et le lait maternel. Le corps a aussi une production endogène de carnitine en utilisant la lysine et la méthionine et elle se retrouve principalement dans les muscles sous forme libre ou estérifiée avec un groupe acyl (105). La quantité de carnitine dans le sérum varie selon l'âge et le sexe, ainsi elle est inférieure chez la femme et est à son plus bas niveau aux premiers jours de la vie. Vu leur biosynthèse inadéquate, les nouveau-nés sont à risque de carence en carnitine, l'apport exogène devient alors essentiel afin d'éviter une déficience dans l'oxydation des acides gras et une céto-genèse i.e. une formation de corps cétoniques (106). Le lait maternel devient donc la principale source de carnitine pour les nourrissons puisqu'il contient de 39 à 63 nmol/ml de carnitine (107). Toutefois, le lait de vache en contient une quantité plus importante soit 160 à 200 nmol/ml. Bien que la quantité par ml soit plus élevée dans le lait de vache, la concentration en carnitine dans le plasma d'un nouveau-né nourri au sein est supérieure puisque la carnitine du lait maternel est mieux absorbée (105). Pour revenir aux concentrations plasmatiques de carnitine, elle est de 15  $\mu\text{M}$  chez le nouveau-né, puis augmente à 40  $\mu\text{M}$  chez la femme adulte et à 50  $\mu\text{M}$  chez l'homme adulte. Il semblerait donc que les hormones sexuelles jouent un rôle important dans la régulation de la carnitine. De plus, en règle générale, la diète d'un omnivore fournit de 2 à 12  $\mu\text{mol}$  de carnitine par jour par kg de poids. La diète fournit donc davantage de carnitine que la synthèse endogène estimée à 1.2  $\mu\text{mol}$  par jour par kg de poids (105). Les niveaux de carnitine plasmatique sont aussi inférieurs chez les végétariens comparativement aux omnivores (108), puisque la source principale de carnitine est d'origine animale.

Chez l'humain, la carnitine provenant de la diète représente de 54 % à 87 % et elle est absorbée dans le petit intestin de façon active, toutefois, les doses pharmacologiques sont plutôt absorbées de façon passive (109). Pour ce qui est des transporteurs actifs impliqués dans le métabolisme de la carnitine, une

étude récente dans notre laboratoire a confirmé que le principal transporteur actif de la carnitine est le OCTN-2 (organic cation/carnitine transporter) sodium dépendant, localisé au niveau de la bordure en brosse de l'épithélium intestinal (110).

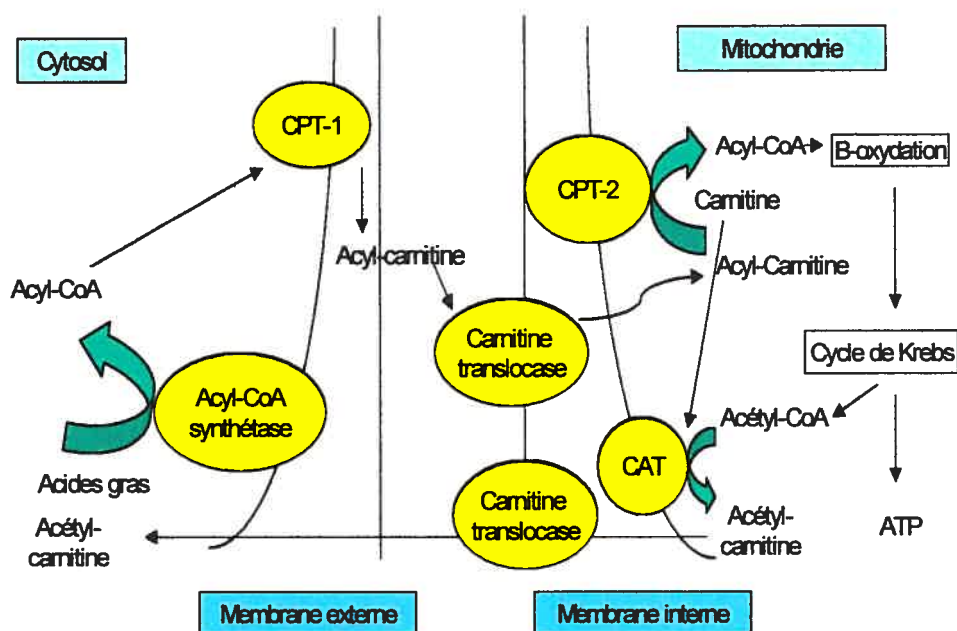
La L-carnitine joue un rôle fondamental pour la  $\beta$ -oxydation mitochondriale des acides gras à chaîne longue. De plus, cet acide aminé régularise le transfert des substances et l'équilibre énergétique à travers les membranes cellulaires. De façon plus explicite, les acides gras à chaîne longue (acyl-CoA) sont transestérifiés à la carnitine par une réaction catalysée à l'aide de la palmitoyltransférase I (CPT-1). Ensuite, l'acylcarnitine-ester à longue chaîne entre à travers la mitochondrie à l'aide de la carnitine-acylcarnitine translocase. Une fois passée les membranes mitochondriales, l'acylcarnitine est reconvertie par le palmitoyltransférase II (CPT-2) en acyl-CoA. L'acyl-CoA peut alors subir la  $\beta$ -oxydation dont le but est de fournir de l'énergie aux cellules (111,112). (Voir figure 2, p.22)

La L-carnitine facilite le transport des acides gras à chaîne longue, mais aussi celui des acides gras à chaîne moyenne et courte tels le butyrate, et ce à travers les mitochondries, afin de fournir de l'énergie par la  $\beta$ -oxydation (111). En plus de faciliter le transport du butyrate, des expériences in vivo sur des souris, ont montré que l'effet antinéoplasique de la carnitine peut être expliqué par l'augmentation de la demi-vie du butyrate, qui se produit en conjuguant le butyryl-CoA à la carnitine, à l'aide de l'enzyme carnitine acétyltransférase (CAT) retrouvée sur la membrane interne de la mitochondrie cellulaire. En effet, le butyrate possède une courte demi-vie et il est difficile de maintenir des concentrations effectives de butyrate dans le côlon, ce qui explique en partie les résultats non concluants des études in vivo (113,114,115).

En plus d'améliorer la biodisponibilité du butyrate, la carnitine joue un rôle de régulation de la réponse immunitaire, et c'est pour cette raison que l'on explore son potentiel immunitaire dans certaines maladies auto-immunes telles

le Sida et le choc septique (116). Il a été également démontré que non seulement la carnitine agit comme antioxydant en inhibant les dommages oxydatifs générés par le cancer (111,117), mais une fois combinée à un acide gras tel l'acétate ou le butyrate, son activité antioxydante demeure (118).

**Figure 2 : Métabolisme des acides gras modulé par la carnitine**



Adapté de Gianfranco et al (111)

Figure 2 : Modèle simplifié du système de la carnitine. 1) Synthèse de l'acyl-CoA à partir des acides gras à l'aide de l'enzyme acyl-CoA synthétase. 2) Estérification de l'acyl-CoA à la carnitine par le CPT-1. 3) Passage de l'acyl-carnitine au travers de la membrane interne à l'aide de la carnitine translocase. 4) Reconversion de l'acyl-carnitine en acyl-CoA par le CPT-2. 5) β-oxydation de l'acyl-CoA. 6) Conjugaison de l'acétyl-CoA et de la carnitine par la CAT pour former l'acétyl-carnitine qui traverse de nouveau les membranes à l'aide de la carnitine translocase.

## **4.0) La biologie cellulaire et moléculaire du cancer**

### **4.1) Le processus de développement du cancer**

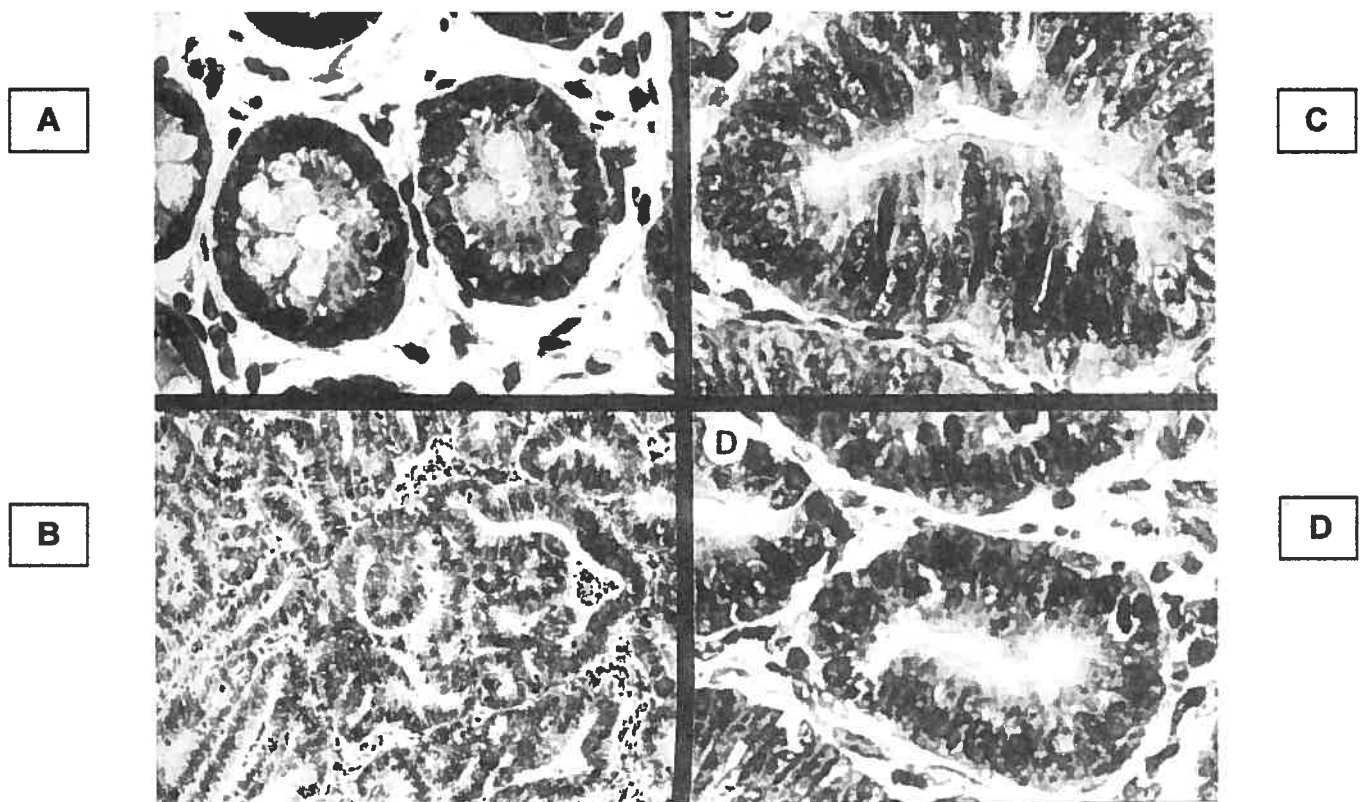
Il est clair que l'être humain est exposé à une large variété de carcinogènes chimiques, viraux, radioactifs, physiques et environnementaux et à cela vient se greffer le profil génétique de l'individu qui est en soit un facteur important dans la susceptibilité de développer un cancer (119). Ainsi dans cette partie, nous allons traiter, d'après la littérature scientifique, des différentes étapes du processus de la carcinogenèse soit l'initiation, la promotion et la progression

En premier lieu, l'initiation de la tumeur débute par des dommages à l'ADN cellulaire causés par l'exposition du matériel génétique de la cellule à des carcinogènes de différents types. À moins d'être réparés, les dommages à l'ADN entraînent des mutations génétiques lesquelles altèrent le rôle des cellules, leur coordination et leur croissance. Par la suite, un agent promoteur de tumeur est nécessaire pour le développement ultérieur de celle-ci. Durant cette seconde étape, les cellules endommagées forment des cellules clones, prennent de l'expansion et prolifèrent rapidement puisque tout ordre de croissance est dérégulé. Pendant l'étape de progression de la tumeur, les cellules prénéoplasiques continuent à proliférer, à se regrouper et alors commencent à former des tumeurs (120).

Bien que tous s'entendent sur le fait que le cancer se développe en plusieurs étapes, de l'épithélium normal aux métastases, il subsistait depuis encore récemment quelques controverses quant à l'identification de la plus jeune lésion prénéoplasique. Plusieurs investigations ont étudié le sujet et ont trouvé un consensus comme quoi les cryptes aberrantes sont bien les lésions prénéoplasiques puisqu'elles présentent des altérations morphologiques semblables aux adénomes cancéreux, c'est-à-dire une augmentation volumique, un épaississement de l'épithélium, une augmentation de la zone péricryptale, une stratification du noyau et une apparition de la forme ovoïde du

noyau. De plus, les études ont confirmé que le comportement cellulaire, moléculaire et de croissance des cryptes aberrantes supportent l'hypothèse qu'elles sont des lésions prénéoplasiques (121,122). Plus particulièrement, les cryptes aberrantes peuvent être induites par un carcinogène de manière dose-dépendante, leur croissance est affectée par des modifications diététiques et elles sont davantage présentes dans le côlon distal que dans le proximal. Quelques mutations génétiques ont également été retrouvées dans les cryptes soit le c-fos, le K-ras et l'APC, les mêmes que l'on rencontre dans les cellules cancéreuses (121). Néanmoins, même si ces lésions sont prénéoplasiques, elles ne deviennent pas toutes des micro-adénomes puisque le développement complexe se fait en plusieurs étapes et toutes les lésions n'accèdent pas au stade suivant.

**Figure 3: Cryptes aberrantes et adénocarcinomes**



Mclellan et al (122)

Figure 8 : Photomicrographies d'une muqueuse normale du côlon et des adénocarcinomes après injection d'un carcinogène chimique chez des souris. A) Muqueuse normale. Noter la forme circulaire des cryptes et des noyaux. B) Adénocarcinomes. C) Adénocarcinomes de B à plus grande magnitude. Noter les cryptes allongées et les noyaux stratifiés. D) Autres adénocarcinomes avec la même morphologie que les cryptes aberrantes.

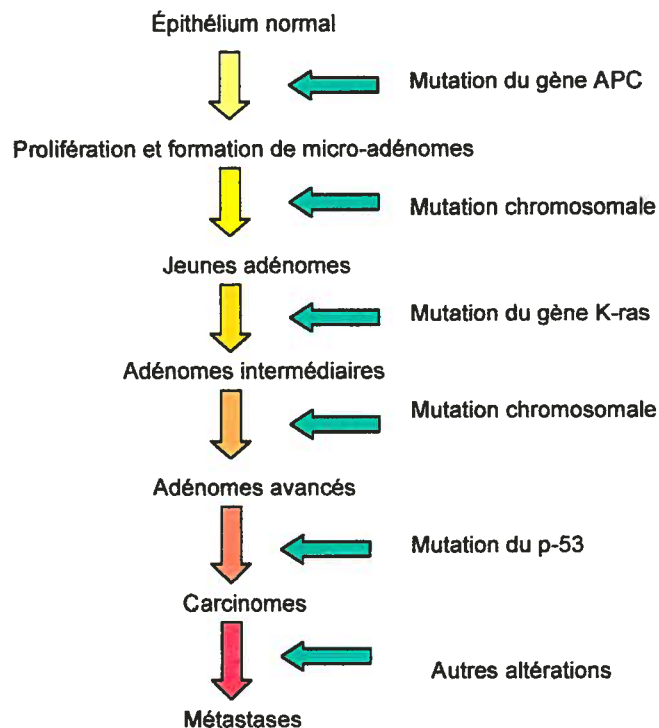
Pour revenir aux mutations génétiques, elles sont en fait de deux types, celles touchant les oncogènes et celles affectant les gènes suppresseurs des tumeurs. Les oncogènes mutants peuvent promouvoir le développement du cancer, alors que l'inactivation d'un gène suppresseur causée par une mutation résulte à une perte du contrôle de la croissance. Plus spécifiquement, les gènes mutants les plus mis en cause sont l'APC, le K-ras et le p53.

(Voir figure 4, p.26)

Tout d'abord, la mutation du gène APC est responsable de l'hyperprolifération de l'épithélium normal, ce qui crée alors des micro-adénomes. Par la suite, la mutation du K-ras arrive un peu plus tard dans le processus cancéreux, ce qui va permettre à l'adénome d'augmenter de diamètre et d'acquérir un potentiel malin. En ce qui concerne le gène p53, sa mutation survient fréquemment à un stade plus avancé où l'adénome va devenir un carcinome. De plus, au niveau moléculaire, d'autres altérations génétiques s'accumulent aux différents stades de la carcinogenèse entraînant des changements notables et des dérèglements dans la prolifération et dans l'apoptose des cellules (120). En effet, dans le cancer du côlon, on note une augmentation du nombre de cellules en prolifération et une inhibition de l'apoptose, ce qui confère la survie à ces cellules cancéreuses et leur résistance au traitement anticancéreux.



**Figure 4 : Les étapes du développement du cancer du côlon**



Adapté de Fearon et Jones (120)

#### 4.2) La prolifération cellulaire

Normalement, la cellule en prolifération franchit une suite d'étapes du cycle cellulaire soit G1 (croissance cellulaire), S (période de synthèse de l'ADN), G2 (préparation de la division cellulaire) et M (mitose et génération des deux cellules filles). À travers ce cycle, différents mécanismes moléculaires commandent l'avancement d'une phase à l'autre et les transitions sont initiées par des protéines kinases hétérodimères activées. Ces hétérodimères appelés cdk-cyclines déclenchent la phosphorylation de plusieurs autres protéines, afin de les activer ou alors de les inhiber. Ainsi, leur activation ou leur inhibition permet de régulariser les mécanismes moléculaires impliqués dans la prolifération cellulaire.

Toutefois, avant qu'une cellule puisse entrer dans le cycle, elle doit nécessairement recevoir des signaux afin d'induire un groupe de gènes à réponse précoce. Parmi les protéines codées pour ce groupe de gènes, se trouvent des facteurs de transcription qui induisent l'expression des protéines cyclines (D et E) et des cdk (2, 4, 5) et de cette façon, le cycle cellulaire en phase S peut débuter. Dès que la cellule est engagée dans cette phase, la cycline A et la cdk-2 s'associent ensemble. Par après, il y a réplication complète de l'ADN de la cellule, puis ensuite, la cellule entre dans la phase G2. Le passage de G2 à la phase mitotique dépend de l'activation du facteur MPF (mitose promotor factor), lui-même dépendant de l'association entre la cycline B et la cdk1. Ce facteur est en fait impliqué dans les processus essentiels précédant la division cellulaire tels que la condensation des chromosomes et la dispersion de l'enveloppe nucléaire. À la suite de l'inactivation du MPF, il s'ensuit la ségrégation de chromatines sœurs, l'éloignement polaire des chromosomes, le décondensation des chromosomes, la reformulation de l'enveloppe nucléaire ainsi que le remaniement des organites intracellulaires afin de générer deux nouvelles cellules filles en phase G1 (123).

**Figure 5 : Le cycle cellulaire**

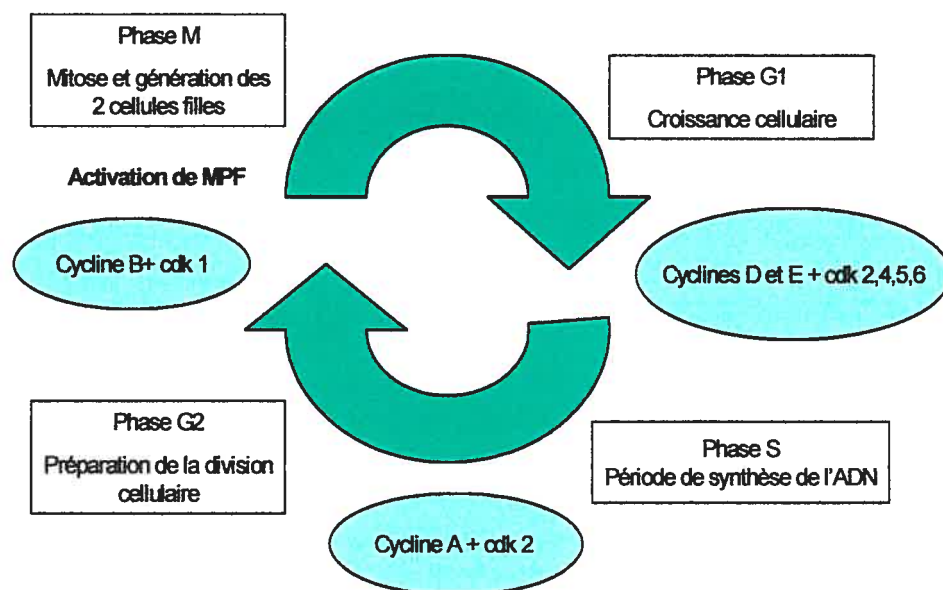
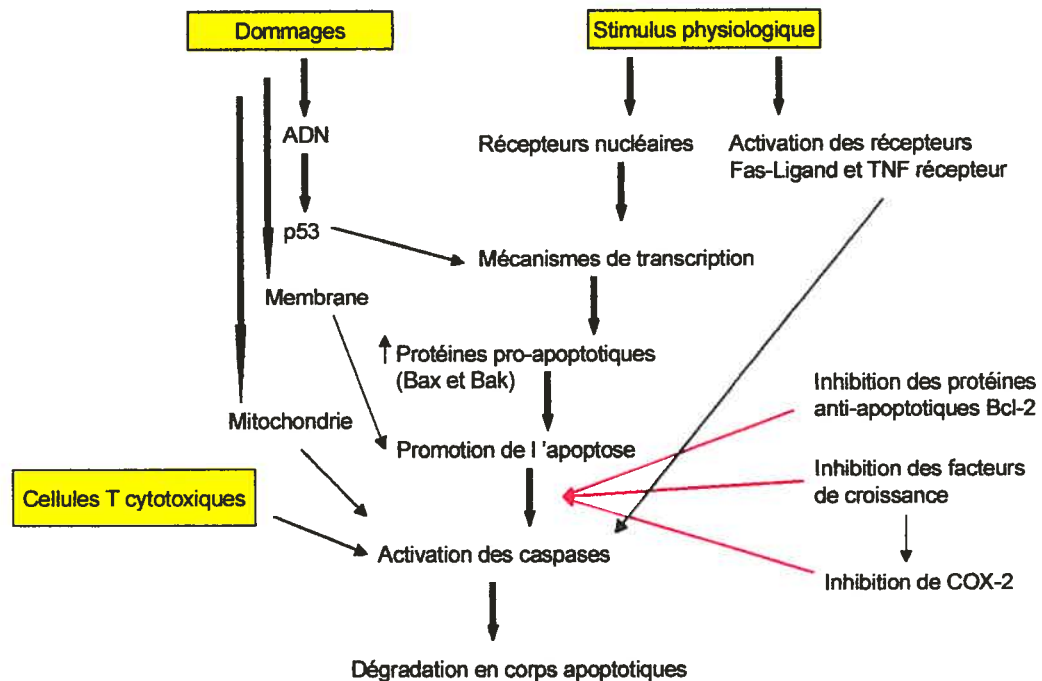


Figure 5 : Interaction entre les cyclines et les cdk durant le cycle de croissance cellulaire

#### 4.3) L'apoptose cellulaire

L'apoptose est également un processus dérégulé par les altérations génétiques. Normalement, l'apoptose ou mort cellulaire programmée constitue un moyen de protéger l'organisme contre les cellules dont l'ADN a été endommagé. La présence de protéines pro-apoptotiques sur la mitochondrie diminue le potentiel transmembranaire et provoque la libération du cytochrome-c dans le cytosol. Ensuite, avec l'aide de l'ATP intracellulaire, le cytochrome-c se lie et active l'APAF-1 (apoptosis protease-activating factor-1), qui lui-même se lie aux caspases, capables de déclencher une cascade de réactions apoptotiques. Les cellules voient alors leur ADN se fragmenter et se dégrader en corps apoptotiques, qui seront par la suite phagocytés par les macrophages. Toutefois, tout comme pour la prolifération, l'apoptose doit être initiée par des signaux externes tels que les dommages aux composantes cellulaires, la cytotoxicité des cellules T ou encore les stimuli physiologiques permettant la liaison à la surface cellulaire d'activateurs apoptotiques à leurs récepteurs comme le Fas-récepteur ou le TNF-récepteur. Une fois, cette étape lancée, les protéines intracellulaires pro-apoptotiques débutent leur travail (124).

(Voir figure 6, p.29)

**Figure 6 : Les événements apoptotiques**

Adapté de Wyllie (124)

Figure 5 : Représentation schématisée des événements apoptotiques : 1) Les dommages, les stimuli physiologiques et les cellules T cytotoxiques activent les protéines pro-apoptotiques et les caspases. 2) Dans le processus, l'inhibition des inhibiteurs de l'apoptose est nécessaire pour le déroulement du processus apoptotique.

#### 4.4) Les mécanismes moléculaires

##### 4.4.1) Le gène p53

Une étude in vivo sur un modèle animal a démontré que le gène p53 joue un rôle dans le contrôle du développement des tumeurs et agit tel un gardien du génome (125). En effet, le gène p53 suppressif de tumeurs protège la cellule en initialisant un processus d'apoptose capable d'éliminer les cellules présentant un défaut génétique et en réparant l'ADN endommagé en phase

G2-M du cycle cellulaire (126). Ainsi, lors d'un dommage à l'ADN cellulaire, il y a une augmentation de l'expression du gène p53, entraînant un arrêt du cycle cellulaire en phase G2-M, puis l'induction de l'apoptose cellulaire (126). Il est également intéressant de noter que le gène p53 régularise l'expression des gènes de la famille Bcl-2, des protéines contrôlant l'apoptose. En effet, la transcription du Bax, une protéine pro-apoptotique, est activée par le p53, alors que l'expression de Bcl-2, une protéine anti-apoptotique, est atténuée par le p53 (127).

Le rôle du p53 a aussi été montré au niveau de l'efficacité du traitement contre le cancer, car le bon fonctionnement de ce gène est requis pour l'exécution d'une apoptose efficace suivant l'administration des agents anticancéreux. (128). Le statut du gène p53 de chaque individu est donc devenu important à connaître afin de déterminer l'efficacité probable d'un traitement.

Cependant, une mutation de ce gène est le plus commun des changements génétiques accompagnant la carcinogenèse du côlon et ce, tant dans les cryptes aberrantes que dans les tumeurs (129). Une étude a démontré que les biopsies du cancer du côlon expriment 30 % de plus que la normale, le gène p53 mutant et que son expression augmente selon la gravité de la tumeur colorectale (125). De plus, une mutation de p53 est impliquée dans la genèse et la progression du carcinome colorectal, puisque 42 % des cryptes aberrantes et plus de 75 % des tumeurs présentent une mutation sur au moins un allèle de p53 (130). Ainsi, la mutation de ce gène joue un rôle prépondérant dans le mécanisme de prolifération et de développement des tumeurs. Autre fait intéressant, la mutation du gène p53 apparaît comme étant liée à l'alimentation, puisqu'une étude épidémiologique a récemment démontré que les sujets fervents de la diète de type occidental ont davantage de mutations sur le gène p53 que le groupe contrôle (131).

#### 4.4.2) La cyclooxygénase-2

La cyclooxygénase est composée de deux isoformes, le COX-1 et le COX-2, le premier étant constamment exprimé dans la plupart des tissus normaux et joue un rôle d'homéostasie, tandis que le COX-2 est induit, seulement dans les cellules cancéreuses, par des cytokines, des facteurs de croissance et des oncogènes (132).

La cyclooxygénase-2 est par ailleurs impliquée dans le développement du cancer, puisque la voie apoptotique des cellules cancéreuses est régulisée par celle-ci. Ainsi, une élévation de l'expression du COX-2 est en relation avec une incidence accrue de tumeurs colorectales. En effet, son expression est augmentée de 45 % dans les adénomes et de 85 % dans les carcinomes du côlon (133).

Plus particulièrement, le COX-2 est l'enzyme clé pour convertir les prostaglandines (PGs) et autres eicosanoïdes à partir de l'acide arachidonique (134). Plus précisément, l'acide arachidonique (AA), un acide gras polyinsaturé, se retrouve à travers la membrane cellulaire phospholipidique. Les enzymes phospholipases rendent ensuite l'AA sous forme libre afin d'être converti en prostaglandines  $H_2$  ( $PGH_2$ ) par les enzymes cyclooxygénases. Le  $PGH_2$  sert alors de substrat pour une série de synthèses de diverses prostaglandines et thromboxanes soit  $PGE_2$ ,  $PGD_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ ,  $PGI_2$  et thromboxane  $A_2$ . Ces lipides peuvent par la suite quitter les cellules et jouer leurs rôles respectifs. Leurs fonctions dans des conditions physiologiques normales sont de différents types c'est-à-dire la vasodilatation/vasoconstriction, ainsi que le maintien des fonctions rénales, reproductives et gastro-intestinales. Toutefois, dans des conditions pathologiques, les prostaglandines activent l'inflammation et la carcinogenèse (134). (Voir figure 7, p.33)

Dans cette logique, une élévation du COX-2 dans les tumeurs entraîne nécessairement une augmentation de la production des prostaglandines et

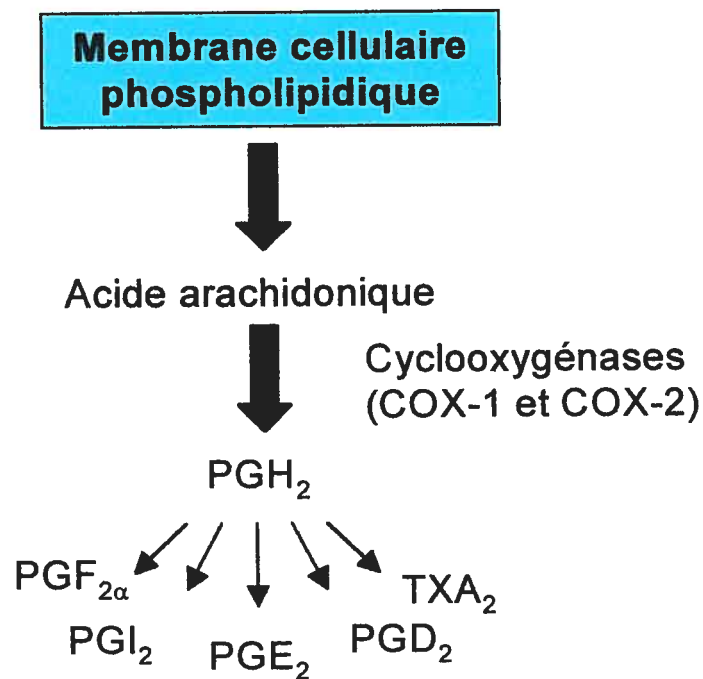
l'ensemble du métabolisme de l'acide arachidonique devient alors altéré. En effet, plusieurs études *in vitro* ont démontré que les niveaux de prostaglandines E2 (PGE<sub>2</sub>) chez les cellules cancéreuses sont nettement supérieurs à la normale, de même que ceux retrouvés dans les biopsies de cancer humain (135). En effet, cette augmentation des PGE<sub>2</sub> sur des biopsies de cancer colorectal est supérieure de plus de 50 % comparativement aux muqueuses normales (133).

Les mécanismes par lesquels le COX-2 contribue à la carcinogenèse et au développement des cellules cancéreuses ont été étudiés par de nombreux investigateurs. Ainsi, ils ont trouvé que le COX-2 joue son rôle à travers cinq mécanismes, c'est-à-dire: 1) l'inhibition de l'apoptose, 2) l'augmentation de l'angiogenèse, 3) l'augmentation de l'invasion métastatique, 4) la modulation de l'inflammation et de l'immuno-suppression et finalement, 5) la conversion des pro-carcinogènes en carcinogènes (132). Concernant le premier mécanisme, des études effectuées sur des lignées de cellules cancéreuses du côlon ont confirmé que le COX-2 inhibe l'apoptose via une élévation de l'expression de la protéine Bcl-2 et via l'inhibition de la caspase-3 et du gène p53 (132). Tsujii et al ont aussi montré que la surexpression du COX-2 dans les Caco-2 entraîne la production de facteurs de croissance pro-angiogéniques tels le VEGF (vascular endothelium growth factor) lesquels modulent la vascularisation des tumeurs et initient la formation des métastases (136). Il a été également démontré par le même groupe de chercheurs, que le COX-2 joue de pair avec les métalloprotéinases afin de promouvoir l'invasion des cellules cancéreuses à travers les vaisseaux sanguins (137). La surexpression du COX-2 dans les cellules cancéreuses, contribue également via l'augmentation de la synthèse des PGE<sub>2</sub>, à inhiber la prolifération des lymphocytes T et B, à inhiber l'activité des cellules NK et à diminuer la production des TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor), tous contribuant à l'immunosuppression (132).

Les travaux de recherche doivent se concentrer sur les substances capables de diminuer l'expression du COX-2 et la synthèse des

prostaglandines, car la voie par laquelle le COX-2 agit dans le cancer est devenue un but majeur de prévention. On a notamment découvert que des inhibiteurs spécifiques du COX-2 tels les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (138), le butyrate (100) et les acides gras oméga-3 (139) ont la capacité de réduire l'expression et sont des outils potentiels de prévention et de traitement contre le cancer colorectal.

**Figure 7 : Biosynthèse des prostaglandines**



#### 4.4.3) La famille des protéines Bcl-2

Les protéines de la famille des Bcl-2 sont localisées dans la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et la membrane nucléaire. Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont démontré que les expressions des protéines Bak et Bax (pro-apoptotiques) sont diminuées dans le cancer du côlon tandis que celles de Bcl-2 et Bcl-x, deux protéines anti-apoptotiques, sont augmentées, ce qui a pour effet de diminuer l'apoptose (140,141). Ce mécanisme moléculaire étant très



présent dans le développement du cancer, il demeure un élément, tout comme le p53 et le COX-2, sur lequel on doit agir afin de prévenir le développement du cancer.

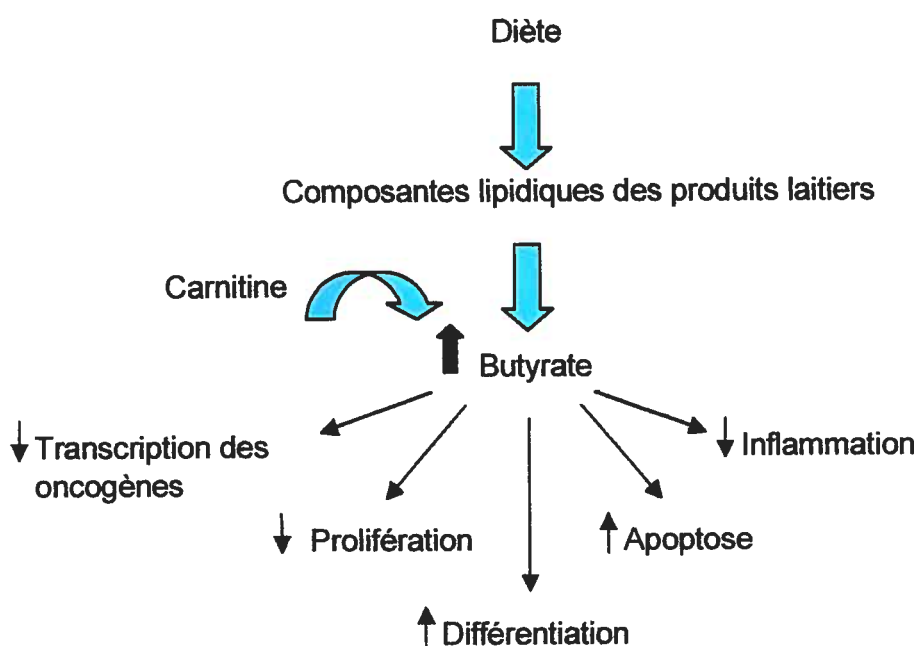
### **5.0) Stratégies dans la prévention primaire du cancer du côlon**

Les nombreuses études épidémiologiques sur la relation entre la nutrition et le cancer ont rapporté la forte évidence que les habitudes alimentaires ainsi que les caractéristiques anthropométriques et l'activité physique jouent tous des rôles importants dans l'étiologie du cancer du côlon. Ainsi, les recommandations de la santé publique prônant de bonnes habitudes alimentaires ont intérêt à être suivies par la population afin de prévenir davantage le cancer et de réduire la mortalité découlant de cette maladie, encore très importante. En effet, le pronostic des patients atteints de cancer reste sombre avec un taux de survie moyen de 50 % après cinq ans (142). De façon plus spécifique, les études relatent depuis longtemps les effets bénéfiques des fruits, des légumes et des fibres et les effets plutôt néfastes de la viande rouge et des charcuteries sur le cancer du côlon. Toutefois, plus récemment, on a démontré que plusieurs autres aliments tels que les produits laitiers semblent avoir des propriétés anticancéreuses très importantes. On gagnerait donc énormément à les inclure dans les recommandations de santé publique, afin de promouvoir leur consommation quotidienne qui comme on le sait, diminue avec l'âge. (Voir figure 8, p.35)

Les conclusions de cette étude s'appliquent spécifiquement à deux composantes des produits laitiers soit la carnitine, un acide aminé, et le butyrate, un acide gras saturé quant à leurs effets bénéfiques sur le cancer du côlon. Toutefois, il est important de spécifier que les produits laitiers ne sont pas les seuls aliments à contenir de la carnitine et que d'autres aliments comme les viandes en contiennent une quantité plus importante. De plus, il est juste de dire que les fibres alimentaires produisent plus de butyrate via leur fermentation au niveau du côlon que les produits laitiers peuvent en contenir.

Néanmoins, en considérant que le cancer du côlon est un type de cancer très fréquent en Amérique du Nord et que son incidence augmente avec les années, on doit se munir en tant que population du nombre le plus important d'outils de prévention pour contrer ce fléau. En fait, la prévention de ce cancer vient en grande partie par le biais de l'alimentation. Comme on le sait déjà, une alimentation riche en fibres est un moyen de prévention et ce, en bonne partie via sa production de butyrate. Toutefois, les apports moyens en fibres des nord-américains atteignent à peine la moitié des recommandations nutritionnelles, l'intérêt pour les produits laitiers rentre en ligne de compte comme un autre moyen de prévention. En effet, ils contiennent bien sûr du butyrate, mais également de la carnitine et d'autres composés tels le calcium, l'ALC, les probiotiques, la sphingomyéline, ayant des effets bénéfiques sur le cancer du côlon. En considérant l'ensemble de ce point de vue, il nous donc apparu intéressant de centrer notre étude sur les produits laitiers.

**Figure 8 : Schéma résumé de la prévention**



## **DESCRIPTION DU PROJET DE RECHERCHE**

### **1.0) Hypothèses et objectifs**

Nous avons testé l'hypothèse selon laquelle le butyrate et la carnitine, seuls ou en combinaison, sont capables de prévenir le cancer colorectal. Nous avons utilisé pour ce faire, un modèle in vitro et deux modèles in vivo afin de pouvoir examiner l'effet du butyrate et/ou de la carnitine sur la prolifération et l'apoptose de cellules cancéreuses du côlon. De plus, les mécanismes moléculaires par lesquels ces composants exercent leurs effets anticancéreux ont été étudiés dans le modèle in vitro. Parallèlement, les deux modèles in vivo nous ont permis d'examiner l'effet du butyrate et de la carnitine sur l'initiation des lésions préneoplasiques et leur développement vers des tumeurs colorectales.

### **2.0) Le modèle in vitro**

Une lignée des cellules cancéreuses du côlon humain, Caco-2, a été employée afin d'étudier la contribution de certains nutriments dans la modulation de la carcinogenèse colorectale. L'utilisation de cette lignée est très bien établie dans la littérature (143). Les Caco-2 ont la capacité de se différencier spontanément en cellules matures et une fois différenciées, ces cellules, dérivées d'un carcinome humain du côlon, présentent la morphologie et les fonctions des cellules intestinales. Toutefois à leur état de cellules homogènes indifférenciées et sous-confluentes, elles possèdent les caractéristiques générales des cellules cancéreuses du côlon. (144).

### **3.0) Les modèles in vivo**

Pour les expériences in vivo, nous avons utilisé deux modèles de souris, l'un environnemental et l'autre génétique, afin de mieux vérifier l'impact des diètes sur le développement du cancer de côlon. Ces deux modèles de souris

ont été fortement utilisés par d'autres chercheurs et leur fiabilité respective a été démontrée dans plusieurs études in vivo sur le cancer.

### 3.1) Le modèle AOM

Tout d'abord, la souris exposée à l'AOM (azoxyméthane) est un très bon modèle environnemental du cancer du côlon, reflétant très bien l'effet d'un carcinogène environnemental sur le développement du cancer. C'est également un bon modèle pour étudier l'effet diététique sur la carcinogenèse. Un modèle environnemental est très important puisque les impératifs du milieu tels l'environnement, l'alimentation et les habitudes de vie sont fortement associés à l'incidence de cancer du côlon (7,11,12). L'agent carcinogène utilisé est l'AOM puisque le développement des tumeurs avec cet agent a été bien investigué à maintes reprises. Ainsi, les souris AOM développent assez rapidement, des tumeurs colorectales et acceptent bien les différentes diètes.

Ces souris ont également l'avantage de pouvoir vivre plus longtemps que les souris transgéniques, ainsi les diètes ont davantage le temps d'agir sur la carcinogenèse. En effet, il a été démontré que les souris AOM nourries par une diète riche en fibres céréalières ont nettement moins développé de tumeurs que le groupe contrôle (145). Une autre étude in vivo a montré l'effet inhibiteur des flavonoïdes, présents dans les légumes, sur l'initiation des lésions préneoplasiques chez les souris AOM (146). Malgré des études concluantes, certains chercheurs pouvaient encore hésiter à utiliser ce modèle animal puisqu'il se rapproche moins du modèle l'humain. Cependant, une étude récente a prouvé que ce modèle est un reflet représentatif de la carcinogenèse chez l'homme, puisque le gène APC devient aussi mutant chez les souris AOM (147), comme quoi l'AOM crée une mutation de ce gène. Cette découverte est importante pour reconnaître le lien commun entre ce modèle expérimental et l'humain.

### 3.2) Le modèle Min

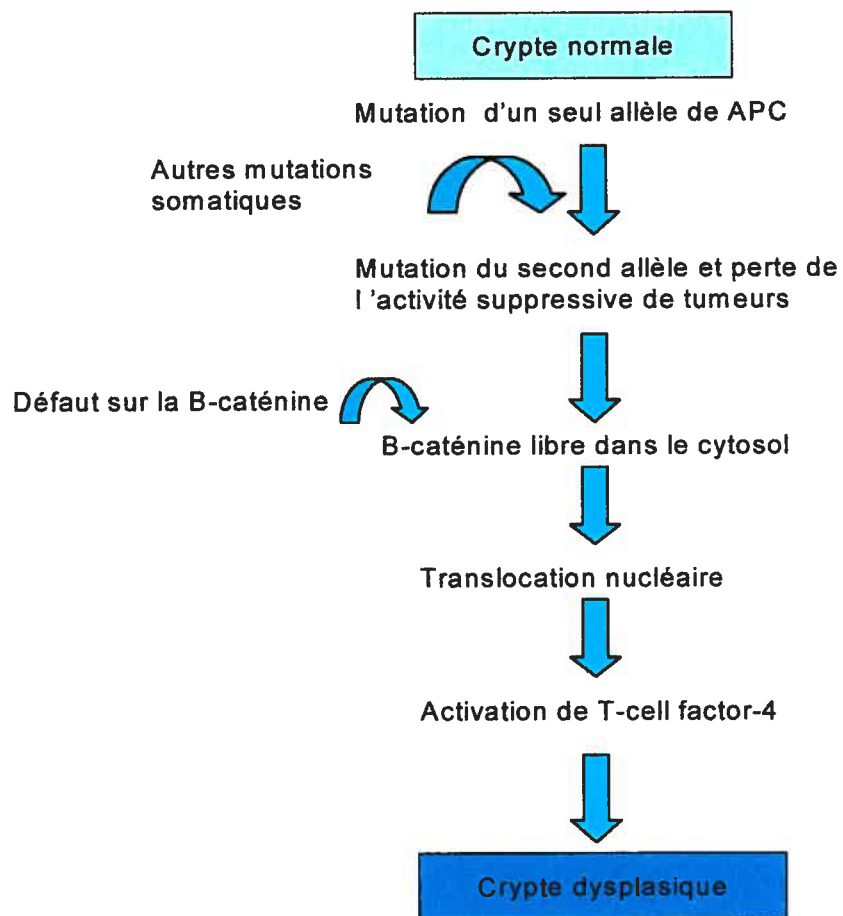
Le second modèle in vivo est appelé la souris Min (multiple intestinal neoplasia). Les souris Min présentent une mutation hétérozygote sur le codon 850 du gène APC (APC<sup>Min/+</sup>) suppressif de tumeurs. Il est en fait obligatoire d'employer des souris hétérozygotes, car les souris homozygotes APC<sup>Min/Min</sup> meurent avant leur naissance, alors que les hétérozygotes ont une espérance de vie de 150 jours (148). Ces souris développent à un très jeune âge de nombreux polypes et adénomes dans le petit intestin, mais seulement quelques-uns dans le côlon. Néanmoins, les souris Min commencent à développer des micro-adénomes colorectals à un âge plus avancé. Cette situation a été expliquée par le fait que la simple mutation d'un allèle du gène APC n'est suffisante pour entraîner le développement des tumeurs colorectales et que la mutation des deux allèles du gène APC ainsi que d'autres mutations présentent dans un processus plus avancé (K-ras et le p53), sont nécessaires pour voir apparaître des tumeurs colorectales chez les souris Min (148,149).

Le plus intéressant concernant ce modèle est sûrement le fait que cette mutation du gène APC se trouve aussi chez les humains dans un mode autosomal-dominant et cause le syndrome de *polypose familiale*. Les individus possédant cette mutation développent un nombre important de polypes adénomateux au niveau du côlon en bas âge. De plus, des études cliniques ont démontré que les mutations du gène APC se voient entre 50 % à 80 % des cas de cancer du côlon (150,151). Il est donc clair que les souris Min constituent un excellent modèle représentatif de cancer du côlon et c'est pourquoi il est de plus en plus utilisé dans les études in vivo. Ce modèle permet de tester l'influence des altérations de la diète sur le cancer dont les effets peuvent supprimer jusqu'à 80 % du nombre d'adénomes (152,153).

Une étude a montré que de traiter des souris Min avec des dérivés de soya a permis de réduire de 42 % à 50 % le nombre de tumeurs intestinales (154). Orner et al ont aussi montré que le thé blanc et le thé vert sont très efficaces

pour inhiber le développement des tumeurs intestinales chez les souris Min (155). De plus, Davis et al ont conclu que les souris Min répondent bien aux effets anticancérigènes de sélénium, puisque celles nourries avec la diète riche en sélénium présentent un nombre moindre de tumeurs intestinales comparativement à celles des autres diètes (43). Encore plus près de notre recherche, une étude effectuée sur ces souris a démontré que la lactoferrine bovine, présente dans le lait de vache, inhibe la carcinogenèse intestinale chez les souris Min (152).

La perte du gène APC suppressif de tumeurs, augmente la prolifération, réduit l'apoptose et diminue la migration des entérocytes, tous des événements observés dans les tumeurs intestinales (156). Plus spécifiquement, à la suite de la perte du second allèle du gène APC causée par d'autres événements génétiques, il n'y a plus de diminution de l'expression de la  $\beta$ -caténine, laquelle s'accumule dans le cytoplasme et se localise dans le noyau afin de former un complexe avec le facteur de transcription Tcf-4 (t-cell factor-4). Ce dernier active alors des oncogènes tels le c-myc et la cycline D1, associés à la carcinogenèse et au développement des cryptes dysplasiques. Ainsi, la chimoprévention des différents facteurs diététiques sur le développement du cancer agirait sans doute en compensant et en normalisant les altérations causées par la mutation de APC (157). (Voir figure 9 p.40)

**Figure 9 : Modèle de la mutation du gène APC**

Adapté de Van der Meer (157)

**MECHANISTICS STUDIES ON THE PREVENTION OF COLON  
CANCER BY BUTYRATE AND CARNITINE**

Marie-Josée Roy<sup>1</sup>, Serge Dionne<sup>2</sup>, Denise Lévesque<sup>2</sup>, Ernest G Seidman<sup>1,2</sup>

Departments of Nutrition<sup>1</sup> and Pediatrics<sup>2</sup>

Centre de Recherche, Ste-Justine Hospital, University of Montreal

Running title: Anticarcinogenic effects of butyrate and carnitine

**Adresse for Correspondence:** Dr Ernest G Seidman

Chief, Division of Gastroenterology and Nutrition  
Ste-Justine Hospital,  
3175 Cote Ste-Catherine Rd.  
Montreal, Quebec, H3T 1C5  
Tel: 514-345-4626  
Fax: 514-345-4999





**ABSTRACT**

Epidemiological studies support an association between the ingestion of saturated fat and the incidence of colorectal cancer. Butyrate, a short-chain fatty acid present in fiber and dairy products, is a potential anti-carcinogenic compound. We were previously shown that carnitine can enhance the bioavailability of butyrate in vivo. In the present study, we have evaluated the effects of butyrate alone and in combination with carnitine on colon cancer cell proliferation and apoptosis, as well as the molecular mechanisms by which these nutrients prevent colon cancer. Caco-2 cells, a well-established cell model, were incubated with butyrate (2.5 -20mM) with or without carnitine (10mM) for various incubation times. Proliferation was measured by using  $^3\text{H}$ - thymidine method, while apoptosis was detected by flow cytometry, confirmed analysis of denatured DNA typical of apoptotic cells. Bcl-2 family protein expression was examined by Western blotting. The data show that butyrate along with carnitine inhibited proliferation and induced apoptosis of Caco-2 cells. Our experiments also demonstrate that  $\text{PGE}_2$  production was decreased in the treated cells. At the molecular level, expression of Bax and Bak proteins were increased in the cells treated whereas expression of Bcl-x was decreased. Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression was decreased in cells incubated with butyrate and carnitine. Our data indicate that butyrate and carnitine might have beneficial effects on colon cancer by inhibiting neoplastic cell proliferation and by inducing apoptosis via downregulating anti-apoptotic and upregulating pro-apoptotic genes.

**KEYWORDS**

Butyrate, carnitine, colon cancer, Caco-2 cells, proliferation, apoptosis, protein expression.

## **INTRODUCTION**

Tremendous strides have been achieved in the battle against cancer over the past few decades, highlighted by key discoveries about the molecular biology of the cell, leading to novel therapies. However, limited advances have been accomplished in the outcome of colorectal cancer, with stable survival rates (45). Colorectal carcinoma remains as the second leading cause of cancer mortality in occidental countries. The emphasis has thus shifted, in part, to cancer prevention by dietary measures (15, 45).

Recent research had demonstrated that milk fat contains a number of potential anticarcinogenic nutrients, including conjugated linoleic acid, butyric acid, sphingomyelin, others lipids and carnitine (31). In fact, there is increasing epidemiological evidence that the relative risk of colorectal cancer was reduced significantly with higher intakes of dairy products. (7,43,48). However, the specific molecular mechanisms by which milk nutrients induce their beneficial effects have not been fully elucidated.

Butyrate is a short chain fatty acid abundant in bovine milk (7.5-13 mol/100ml) and is also produced by fermentation of dietary fibers and undigested starches by the colonic microflora (31). Short chain fatty acids such as butyrate play a vital role in maintaining colonic epithelial cell integrity and metabolism. This fatty acid is also capable of inhibiting DNA synthesis and cell growth in colonic tumor cell lines (2,3,4,47), to induce differentiation and apoptosis by DNA fragmentation (16,17,20) and via altering pro-oncogene expression (8). Remarkably and paradoxically, butyrate stimulates proliferation of normal colonocytes (18,51). At the molecular level, butyric acid modifies cellular DNA through hypermethylation, histone hyperacetylation and phosphorylation (6,10), events associated with down-regulation and inactivation of oncogene expression (13,37,44). Butyrate may also prevent tumor invasiveness by inhibiting urokinase activity, implicated

in malignant cell penetration of the substratum. (14,31). Indeed, recent studies from our laboratory demonstrated that butyrate upregulates Bak protein in Caco-2 cells and induces caspase-3 mediated cleavage of poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) (38). Several studies have clearly demonstrated the effectiveness of selective COX-2 inhibitors on colon cancer (11,21,46). Further studies are needed to delineate the specific role of nutrients on COX-2 and its effects on prostaglandin synthesis.

Despite epidemiological and in vitro studies demonstrating the beneficial effects of butyrate on colon cancer, in vivo studies have failed to provide conclusive results (12,13,26,51). We speculate that this may be due to the short half-life and the rapid metabolism of butyrate (29), making difficult to maintain effective concentration in the colon to confer benefits. To overcome these difficulties, we proposed in this project to conjugate butyrate with carnitine. This reaction is catalyzed by the reversible reaction of carnitine acetyltransferase, which is present in the small intestine and colonic mucosa (32). The conjugation of butyryl-CoA with carnitine to form butyryl-carnitine should improve the in vivo half-life of ingested butyrate, potentially enhancing the anti-carcinogenic effects of butyrate.

Carnitine is a non-essential amino acid present in foods of animal origin and cow's milk is again a good source, containing 150-200 nmoles/ml (33,40). L-Carnitine modulates substrate flux and energy balance across cell membranes by regulating the transport of long-chain fatty acids into the mitochondrion and their subsequent  $\beta$ -oxidation (32). Furthermore, carnitine is a potent antioxidant and an anti-carcinogenic component (1,5,32). Carnitine can conjugate with medium and short chain fatty acids, enhancing their half-life and coincidentally, their beneficial effects. The aim of this research project was to test our hypothesis that the combination of butyrate and carnitine would enhance their

anticarcinogenic properties of either nutrient alone, and to elucidate the molecular mechanisms by which they may prevent colon cancer. We employed the Caco-2 cell line, a well-established in vitro model for studying the mechanisms involved in the regulation of cell turnover and differentiation of cancerous intestinal epithelial cell (23).

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell culture**

Caco-2 cells (American Type Collection, Rockville, MD) were grown at 37 % in Minimum Essential Medium (MEM; GIBCO-BRL, Grand Island, NY), containing 1 % penicillin/streptomycin, 1 % MEM nonessential amino acids (GIBCO-BRL), supplemented with 10 % decompemented foetal bovine serum (FBS; Flow McLean, VA) and maintained in a humidified incubator with 5 % CO<sub>2</sub>. In all experiments, sub-confluent (85 %) Caco-2 cells (passage 30-40) were first plated in MEM with 5% FBS and then treated with various concentrations of either Na-Butyrate alone (Sigma, St-Louis, MO) or conjugated with L-carnitine (Sigma, Steinheim, Germany) using a stock solution (1 M) prepared in MEM and diluted to the desired final concentration in MEM alone or with L-Carnitine followed by pH correction with NaOH. Propidium iodide was purchased from Clontech Laboratories Inc (Palo Alto, CA), ApoStrand Elisa Apoptosis Detection Kit from Biomol Research Laboratories Inc (Plymouth, PA) and Prostaglandin E2 EIA Kit-Monoclonal from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI). Additional reagents used for Western blots were: anti-bcl-x, anti-bax, anti-bak, anti-cox-2 and anti- $\beta$ -actin antibodies from Santa Cruz Biotechnology Inc (Santa Cruz, CA). The anti-goat and anti-rabbit horseradish peroxidases were from Biosource International (Camarillo, Ca).

### **Proliferation assay**

Caco-2 cells were cultured in 24 well plates until 85 % confluence, and then washed twice to remove FBS. The cells were then treated with various concentrations of Na-Butyrate (2.5mM-20mM) alone, or combined with carnitine (10mM) for 48 hours. During the final two hours of culture, <sup>3</sup>H-thymidine was added (2 $\mu$ Ci/ml) to monitor changes in

DNA synthesis. Results are expressed as percentage of  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation compared to control (medium alone).

### **Apoptosis detection assays**

Caco-2 cells were cultured as above, and once sub-confluence was reached, the cells were stimulated with various concentrations of Na-Butyrate (2.5mM-10mM) alone or combined with carnitine (10mM) for 48 hours. The cells were then stained with propidium iodide (PI) and cell death (i.e. apoptotic and necrotic cells) was verified by flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson, Mississauga, On, Canada). In parallel, the ApoStrand Elisa Apoptosis Detection Kit was employed to quantify the number of apoptotic cells with denatured DNA.

### **Quantification of prostaglandin E2**

For these experiments, Caco-2 cells were cultured to sub-confluence as above and then treated with various concentrations of Na-Butyrate (2.5mM-10mM) alone or combined with carnitine (10mM) for 24 hours. During the final two hours, cells were exposed to medium supplemented with 50 $\mu\text{M}$  arachidonic acid. Quantification of prostaglandin E2 ( $\text{PGE}_2$ ) was carried out using the Prostaglandin E2 EIA Kit.

### **Western blot analysis**

Western blotting was employed to monitor changes in the levels of the bcl-2 family of proteins and of cyclooxygenase-2 (COX-2). Sub-confluent Caco-2 cell monolayers were treated with butyrate (2.5-10mM) and carnitine (10mM) for 24 hours and then their lysates were prepared using an ice-cold lysis buffer (50mM Tris, 150mM NaCl, 10mM EDTA, 1

% Triton) containing a mixture of protease inhibitors (Boehringer). After determination of protein concentrations using the Micro BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, IL), equivalent samples (30 $\mu$ g) were resolved using 10 % sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis followed by a 4 % stacking gel and then transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Membranes were blocked in 1 % non-fat milk for one hour and then incubated with Bak (1/900), Bax (1/1000), Bcl-x (1/800), Cox-2 (1/200) and  $\beta$ -actin (1/650) primary antibodies at 4°C overnight. After washing with Tris-buffered saline/Tweed-20 (TBST), membranes were incubated with the corresponding peroxidase-conjugated secondary antibody, anti-goat-IgG or anti-rabbit-IgG, for one hour and then developed according to the enhanced chemiluminescence system (Supersignal West DURA, Pierce).

### **Statistical analysis**

All experiments were performed in duplicate or triplicate and were repeated at least six times. Values were expressed as mean  $\pm$  SEM and were analyzed by Anova, Tukey's Multiple Comparison test, followed by Student's t-test, with the level of significance set at 5 % ( $p < 0.05$ ) for comparison of pairs of groups.



## **RESULTS**

### **Cell proliferation**

To elucidate the effects of butyrate and carnitine on colon cancer cell proliferation Caco-2 cells were incubated with these factors alone or in combination for 48 hours (39). As illustrated in Fig. 1, DNA synthesis was significantly inhibited ( $p < 0.05$ ) by butyrate at concentrations varying from 2.5-20mM. Maximal inhibition was 52.9 % compared to control cells. Carnitine (10mM) also significantly decreased Caco-2 cell proliferation to 89 % vs control ( $p < 0.05$ ). The maximal inhibitory effect was observed with the combination of butyrate (20mM) and carnitine (10mM), with proliferation at 39.8 % vs control (Fig.1).

### **Induction of apoptosis**

The effects of butyrate alone or combined with carnitine on Caco-2 cell apoptosis were examined after 48 hours of incubation. As illustrated in Fig. 2, apoptosis was increased as a result of incubations with butyrate, or the combination of butyrate and carnitine, in a dose manner. For the first step of experiments using PI, sub-confluent Caco-2 cells showed a maximal apoptosis/necrotic effect of 65.7 % compared to 12.9 % for control cells ( $p < 0.05$ ) after 48 hours of incubation with butyrate alone (2.5-10mM). Caco-2 cells cultured in the presence of carnitine (10mM) alone were not found to have a significantly increased rate of apoptosis/necrosis at 48 hours.

The subsequent step was to confirm the effects of the same nutrients by examining morphologic characteristics of apoptosis they induced in Caco-2 cells. For these experiments, we have used the ApoStrand Elisa Detection Kit, which permits the verification of apoptotic cells with denatured DNA. As shown in Fig. 3, similar results were observed as in experiments using PI. Butyrate alone (2.5-10mM) increased apoptosis after

48 hours, with a maximum of 185.2 % control cells ( $p<0,05$ ). Carnitine alone (10mM) also showed a significantly increased apoptosis effect (123.8 %,  $p<0,05$ ). The combination of butyrate and carnitine also induced a significant apoptotic effect after 48 hours, reaching a maximum of 163.4 % ( $p<0.05$ ). However, this effect was not greater than butyrate alone.

### **Quantification of PGE<sub>2</sub> production**

Figure 4 shows that the production of PGE<sub>2</sub> via the COX-2 enzyme pathway was significantly inhibited ( $p<0.05$ ) after 24 hours of incubation with either the addition of butyrate or carnitine to the medium. The maximal effect for butyrate alone was 71 % versus control. Carnitine also induced a significant decrease in PGE<sub>2</sub> synthesis, to 85.5 % of control cells. The maximum decrease was seen with the combination of butyrate and carnitine with an inhibition of PGE<sub>2</sub> to 57 % of control cells ( $p<0.05$ ).

### **Bcl protein expression**

In order to investigate the molecular mechanisms by which these nutrients induced Caco-2 cell apoptosis, changes in the expression of Bak (24 kDa), Bax (21 kDa), Bcl-x (30 kDa) and Cox-2 (69 kDa) were monitored by Western blotting. Incubation of Caco-2 cells with butyrate (2.5-10mM) and carnitine (10mM) resulted in an increase in the expression of Bax and Bak, two pro-apoptotic proteins. Furthermore, a decrease in the expression of Bcl-x, an anti-apoptotic protein, was simultaneously detected (Fig. 5). We also observed that COX-2 levels were decreased in response to butyrate combined with carnitine (Fig. 5). This result is in concert with the decrease of PGE<sub>2</sub> production noted above. Immunoblot analysis of  $\beta$ -actin (43 kDa) was used as a control.

## **DISCUSSION**

Epidemiological studies have demonstrated that cancer is a multifactorial problem and that in addition to genes, diet plays a role in the inter-individual susceptibility to this disease. In fact, nutrients are considered to play key roles as anticarcinogenic factors in the human diet (15-31). Recent studies have demonstrated that dairy products contain some potentially important anticarcinogenic components (43, 50). Interest has been focused on identifying the specific milk factors able to prevent colon cancer and to inhibit tumor growth. The present project was undertaken to evaluate whether the combination of butyrate and carnitine, both present in dairy products, may result in a decrease of colon cancer by inhibiting the proliferation of Caco-2 cells, while inducing their apoptosis in vitro (23). Butyrate, the short-chain fatty acid that is the preferred energy source for colonic epithelial cells, has the remarkable property to inhibit the proliferation and induce apoptosis of a number of cancer cells lines (2,4,16,20). Its effect is greater than propionate and valerate (41). The second nutrient studied, carnitine, is an amino acid with anti-oxidant and anticarcinogenic effects (1,5,32). It is able to improve the short-life of butyrate (27), thus potentially enhancing its anticarcinogenic effects.

In the present set of experiments, we selected butyrate concentrations between 2.5 and 20mM, effective concentrations for experiments on Caco-2 cells as previous studies have already demonstrated (38). Also, this range is found in the intestinal lumen. (30). In fact, 10mM of carnitine was also chosen given that recent reports have shown that this is physiological (10-30mM) for human (36). Finally, experiments reported herein were carried out at 48 hours because previous experiments in our laboratory revealed no inhibitory effect on proliferation using butyrate and carnitine at physiological concentrations at earlier time points.

Our results confirmed earlier studies that butyrate alone potently inhibits Caco-2 cell proliferation in a dose-dependent manner. We also observed that carnitine alone has an inhibitory effect on colon cancer cell proliferation, but weaker than that observed with butyrate. This likely explains why the combination of butyrate and carnitine was not found to have an additive inhibitory effect on cell proliferation. Butyrate has shown to arrest the growth of neoplastic colonocytes both in vivo and in vitro and to inhibit the pre-neoplastic hyperproliferation (3,28). Butyrate is capable of blocking cell proliferation in the G1 phase (42) and G2/M by inhibiting regulatory protein (19). Butyrate also regulates the expression of molecules involved in colonocytes growth and adhesion (37,44). It has been suggested that butyrate down-regulates oncogene expression by causing histone hyperacetylation and DNA hypermethylation (6,10). Carnitine also seems to have an anti-proliferative effect on Caco-2 cells because of its ability to inhibit oxidative damage induced by carcinogens (1,5,32).

The purpose of combining butyrate and carnitine together in the cell proliferation and apoptosis experiments was to potentially enhance the potent anticarcinogenic effects of butyrate by increasing its very short half-life. Our data show that butyrate alone and conjugated with carnitine increased Caco-2 cell death and apoptosis, as demonstrated using two different markers. These results confirm previous reports that butyrate induces apoptosis in various human colorectal carcinoma cells in vitro (16,17,20,24). Carnitine alone demonstrated a lesser ability to induce apoptosis, perhaps because its effect is delayed. In preliminary studies, we observed that higher concentrations were needed to induce apoptosis. Our data revealed that butyrate and carnitine act against colon carcinogenesis by down-regulating pro-oncogene expression and by up-regulating anti-oncogene expression, as reported previously in other models (9,22,25,38).

In this study, we investigated some of the molecular mechanisms by which butyrate and carnitine modulate apoptosis of Caco-2 cells. Specific experiments were carried out to determine their effects on the expression of Bax, Bak and Bcl-x proteins and on the expression of cyclooxygenase (COX-2). We found that apoptotic cell death induced by the combination of butyrate and carnitine was mediated via up-regulation of Bak and Bax, two pro-apoptotic genes. We did not observe this effect with butyrate alone, unlike other studies (25,38). This discordance between their results and ours may be due to factors such as the concentration of butyrate employed, incubation time, cell origin and other experimental conditions. For carnitine alone, less up-regulation of Bak and Bax expression could explain fact that carnitine alone only induced a slight apoptotic effect. Carnitine might also involve another apoptotic pathway. Our data demonstrated that Bcl-x expression, an anti-apoptotic gene, was decreased in Caco-2 cells. These results are in keeping with previous reports showing that milk components have apoptotic effects by increasing Bax and Bak and by decreasing Bcl-x expression (25,38).

We also found that apoptotic cell death induced by the combination of butyrate and carnitine was mediated via inhibition of the enzyme pro-oncogene COX-2. Our observations are in concert with previous reports, which indicated that milk fat components regulate COX-2 expression (9). However, this down-regulation was not observed with butyrate alone. As observed with the Bcl-2 family proteins, carnitine alone did not alter the expression of COX-2. This fits with our observation that carnitine alone has a weak apoptotic effect compared with others milk factors. It well established that COX-2 is a key enzyme in the conversion of arachidonic acid to prostaglandins (PG) and other eicosanoids (49). Recent studies have shown that PGE<sub>2</sub> synthesis is increased in colonic adenocarcinoma (34) and that PGE<sub>2</sub> have a significant proliferative effect on colon cells (35). In view of this, we also

quantified PGE<sub>2</sub> levels in Caco-2 cells. We observed a decrease in PGE<sub>2</sub> production in butyrate treated-Caco-2 cells, and this inhibitory effect was greater for butyrate combined with carnitine. There was also a slight decrease in PGE<sub>2</sub> synthesis in carnitine stimulated Caco2 cells. Our results are thus in keeping with previous reports suggesting that milk components mediated their beneficial effects in part via the eicosanoid pathway.

In summary, butyrate and carnitine have beneficial effects against colon cancer, which inhibit colon cancer cell growth, increase apoptosis and reduce their PGE<sub>2</sub> production. At the molecular level, Bax, Bak, Bcl-x and COX-2 seem to be implicated in their anticarcinogenic effects. Further work is needed to verify these beneficial effects in vivo.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was supported by research grant from the Dairy Farmers of Canada (EGS). The authors wish to thank Sylvie Marineau for her invaluable secretarial assistance. This work constitutes a part of Marie-Josée Roy's MSc thesis for the Department of Nutrition, University of Montreal.

## REFERENCES

1. Ames BN. Micronutrients prevent cancer and delay aging. *Toxicology lett* 102-103: 5-18, 1998.
2. Archer S, Meng S, Jonhson WJ, Tang R, Hodin R. Butyrate inhibits colon carcinoma cell growth through two distinct pathways. *Surgery* 124: 248-253, 1998.
3. Barnard JA, Warwick G. Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT29 cells. *Cell Growth Differ* 4: 495-501, 1993.
4. Basson MD, Turowski GA, Rashid Z, Hong F, Madri JA. Regulation of human colonic cell line proliferation and phenotype by sodium butyrate. *Dig Dis Sci* 41: 1986-1993, 1996.
5. Boerrigte ME, Franceschi C, Arrigoni-Martelli E, Wei JY, Vijg J. The effect of L-carnitine and acyl-L-carnitine on the disappearance of DNA single strand breaks in human peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis* 14: 2131-2136, 1993.
6. Boffa LC, Vidali G, Mann RS, Allfrey VG. Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate. *J Biol Chem* 254: 4383-4390, 1979.
7. Bostick RM. Diet and nutrition in the etiology and primary prevention of colon cancer. In: Bendich A, Deckelbaum RJ, eds. *Preventive nutrition: the comprehensive guide for health professionals*. Totowa, Humana Press, 57-95, 1997.



8. Cioe L, McNab A, Hubbell HR. Differential expression of the globin genes in human K562(s) cells induced to differentiate by Hemin or butyric acid. *Cancer Res* 41(1): 237-243, 1981.
9. Crew TE, Elder DJ, Paraskeva C. A cyclooxygenase (COX-2) selective non-steroidal anti-inflammatory drug enhances the growth inhibitory effect of butyrate in colorectal carcinoma cells expressing COX-2 protein: regulation of COX-2 by butyrate. *Carcinogenesis* 21: 69-77, 2000.
10. De Hann JB, Gevers W, Parker MI. Effects of sodium butyrate on the synthesis and methylation of DNA in normal cells and their transformed counterparts. *Cancer Res* 46(2): 713-716, 1986.
11. Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmoll HJ. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol* 127: 411-417, 2001.
12. Deshner EE, Ruperto JF, Lupton RJ, Newmark HL. Dietary butyrate (tributyrin) does not enhance AOM-induced colon tumorigenesis. *Cancer Lett* 52: 79-82, 1990.
13. Freeman HJ. Effects of differing concentrations of sodium butyrate on 1,2 dimethyldrazine induced rat intestine neoplasia. *Gastroenterology* 91: 596-602, 1986.
14. Gibson PR, Rosella O, Rosella G, Young GP. Butyrate is a potent inhibitor of urokinase secretion by normal colonic epithelium in vitro. *Gastroenterology* 107 (2): 410-419, 1994.
15. Giovannucci E, Rimm ER, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Willer WC. Intake of fat, meat and fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer Res* 54: 2390-2397, 1994.

16. Hague A, Manning AM, Hanlon KA, Huschtscha L, Hart D, Paraskeva C. Sodium butyrate induces apoptosis in a human colonic tumor cell lines in a p53 independent pathway-implications for the possible role of dietary fibers in the prevention of large bowel cancer. *Int J Cancer* 55: 489-505, 1993.
17. Hague A, Paraskeva C. The short-chain fatty acid butyrate induces apoptosis in colorectal tumor cell lines. *Eur J cancer Prev* 4: 359-364, 1995.
18. Hassig CA, Tong JK, Schreiber SL. Fiber-derived butyrate and the prevention of colon cancer. *Chem Biol* 4: 783-789. 1997.
19. Harrison LE, Wang QM, Stuzinski GP. Butyrate induced G2/M block in Caco-2 colon cancer cells is associated with decreased p34<sup>cdc2</sup> activity. *Proc Soc Exp Biol Med* 222: 150-156, 1999.
20. Heerdt BG, Houston MA, Augenlicht LH. Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer Res* 54: 3288-3293, 1994.
21. Jacoby RF, Seibert K, Cole Ce, Kelloff G, Lubet RA. The cyclooxygenase-2 inhibitor colexib is a potent preventive and therapeutic agent in the Min mouse model of adenomatous polyposis. *Cancer Res* 60: 5040-5044, 2000.
22. Koshiji M, Acachi Y, Sogo S, Taketani S, Oyaizu N, Than S, Inaba M, S Phawa, Hioki K, Ikehara S. Apoptosis of colorectal adenocarcinoma (COLO201) by tumour necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) and/or interferon-gamma (IFN- $\delta$ ) resulting from down-modulation of Bcl2 expression. *Clin Exp Immunolog* 11: 211-218, 1998.
23. Levy E, Mehran M, Seidman EG. Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *FASEB J* 9: 626-635, 1995.

24. Litvak DA, Evers BM, Hwang KO, Hellmich MR, Ko TC, Townsend Jr CM. Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells is associated with apoptosis and early induction of p21<sup>Waf1/Cip1</sup> and p27<sup>Kip1</sup>. *Surgery* 124: 161-169, 1998.
25. Liu LU, Holt PR, Krivosheyev V, Moss SF. Human right and left colon differ in epithelial cell apoptosis and in expression of Bak, a pro-apoptotic Bcl-2 homologue. *Gut* 45: 45-50, 1999.
26. Lupton JR. Butyrate and colonic cytokinetics; differences between in vitro and in vivo studies. *Eur J Cancer Prev* 4: 373-378, 1995.
27. Marx G, Lannes M, Dionne S, Levy E, Qureshi I, Levesque D, Seidman EG. Effects of butyrate conjugated linoleic acid and carnitine on Caco-2 cell proliferation and apoptosis. *Gastroenterology* 188: A-550, 2000.
28. Medina V, Afonso JJ, Alvarez-Arguelles H, Hernandez C, Gonzalez F. Sodium Butyrate inhibits carcinoma development in a 1,2 dimethylhydrazine-induced rat colon cancer. *JPEN* 22: 14-17, 1998.
29. Miller AA, Kurschel E, Osieka R, Schmidt CG. Clinical pharmacology of sodium butyrate in patients with acute leukemia. *Eur J Cancer Clin Oncol* 23: 1283-1287, 1987.
30. Mortensen PB, Clausen MR. Short-chain fatty acid in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. *Scand J Gastroenterol* 31(Suppl 216): 132-148, 1996.
31. Parodi PW. Cow's milk fat component as potential anticarcinogenic agent. *J Nutr* 127: 1055-1060, 1997.

32. Peluso G, Nicolai R, Reda E, Benatti P, Barbarisi A, Calvani M. Cancer and anti-cancer therapy-induced modifications on metabolism mediated by carnitine system. *J Cell Physiol* 182: 339-350, 2000.
33. Penn D, Dalderer M, Schmidt-Sommerfeld E. Carnitine concentrations in the milk of different species and infant formulas. *Biol Neonate* 52: 70-79, 1987.
34. Pugh S, Thomas GAO. Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E2. *Gut* 35: 675-678, 1994.
35. Qiao L, Kozoni V, Tsioulinas GJ, Koutsos MI, Hanif R, Shiff SJ, Rigas B. Selected eicosanoids increase the proliferation rate of human colon carcinoma cell lines and mouse colonocytes in vivo. *Bioch Bioph Acta* 1258: 215-223, 1995.
36. Rebouche CJ. Carnitine function and requirements during the life cycle. *FASEB J* 6: 3379-3386, 1992.
37. Reeves R, Dserjesi P. Sodium butyrate induces new gene expression in friend erythroleukemic cells. *J Biol Chem* 254: 4383-4390, 1979.
38. Ruemmele FM, Dionne S, Qureshi I. Butyrate mediates Caco-2 cells apoptosis via upregulation of pro-apoptotic Bak and inducing caspase-3 mediated cleavage of poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP). *Cell Death Differ* 6: 729-735, 1999.
39. Ruemmele F, Ruemmele C, Levy E, Seidman E. Les mécanismes moléculaires de la regulation du renouvellement des cellules épithéliales intestinales par des nutriments. *Gastroenterol Clin Biol* 23: 147-515, 1999.
40. Sandor A, Pecsuvac K, Kerner J, Alkonyi I. On carnitine content of human breast milk. *Pediatr Res* 16: 89-91, 1982.

41. Siavoshian S, Blotti re HM, Le Foll E, Kaeffer B, Cherbut C, Galmiche JP. Comparison of the effect of different short chain fatty acid on the growth and differentiation of human colonic carcinoma cell lines. *Cell Biol Int* 21: 281-287, 1997.
42. Siavoshian S, Segain JP, Kornprobst M, Bonnet C, Cherbut C, Galmiche JP, Blotti re HM and al. Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelium cells; induction of cyclin D3 and p21 expression. *Gut* 46: 507-514, 2000.
43. Slattery ML, Boucher KM, Caan BJ, Potter JD, Ma KN. Eating patterns and risk of colon cancer. *Am J Epidemiol* 148: 4-16, 1998.
44. Souleimani A, Asselin C. Regulation of c-fos expression by sodium butyrate in the human colon carcinoma cell line Caco-2. *Biochem Biophys Res Comm* 193: 330-336, 1993.
45. Sporn MB. The war on cancer. *Lancet* 347: 1377-1381, 1996.
46. Thun MJ, Henley SJ, Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs anticancer agents: Mechanistic Pharmacological and Clinical Issues. *J Natl Can Inst* 94(4): 252-266, 2002.
47. Toscani A, Soprano DR, Soprano KJ. Molecular analysis of sodium butyrate-induced growth arrest. *Oncogen Res* 3(3): 223-238, 1988.
48. Tsuda H, Sekine K, Ushida Y, Kuhara T, Takasuka N, Ligo M, Han BS, Moore MA. Milk and dairy products in cancer prevention: focus on bovine lactoferrin. *Mutat Res* 462: 227-231, 2000.

49. Tsujii M, Kawano S, Dubois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci* 94: 3336-3340, 1997.
50. Van Der Meer R, Lapré JA, Govers MJAP, Kleibeurer JH. Mechanisms of the intestinal effects of dietary fats and milk products on colon carcinogenesis. *Cancer Lett* 114: 75-83.1997.
51. Velazquez Oc, Lederer Hm, Rombeau JL. Butyrate and the colonocyte. Implications for neoplasia. *Dig Dis Sci* 41: 727-729, 1996.

## **FIGURE LEGENDS**

**Figure 1:** Effect of butyrate and carnitine on Caco-2 cell proliferation. Sub-confluent Caco-2 cells were cultured in the absence (control) or the presence of butyrate (2.5-20mM), carnitine (10mM) or butyrate (2.5-20mM) in combination with carnitine (10mM) for 48 hours. Proliferation was measured by incorporation of  $^3\text{H}$ -thymidine. Results are expressed as % versus control (100%) and values represent mean  $\pm$  standard deviation for 10 experiments, each in triplicate.

\* $p < 0.05$ .

**Figure 2:** Effect of butyrate and carnitine on Caco-2 cell death. Sub-confluent Caco-2 cells were stimulated in the absence (control) or the presence of butyrate (2.5-10mM), carnitine (10mM) or butyrate in combination with carnitine for 48 hours. Cell death was quantified by flow cytometry assay using propidium iodide uptake. Results are expressed as % of cell death and values represent mean  $\pm$  standard deviation for 6 experiments, each in duplicate.

\* $p < 0.05$ .

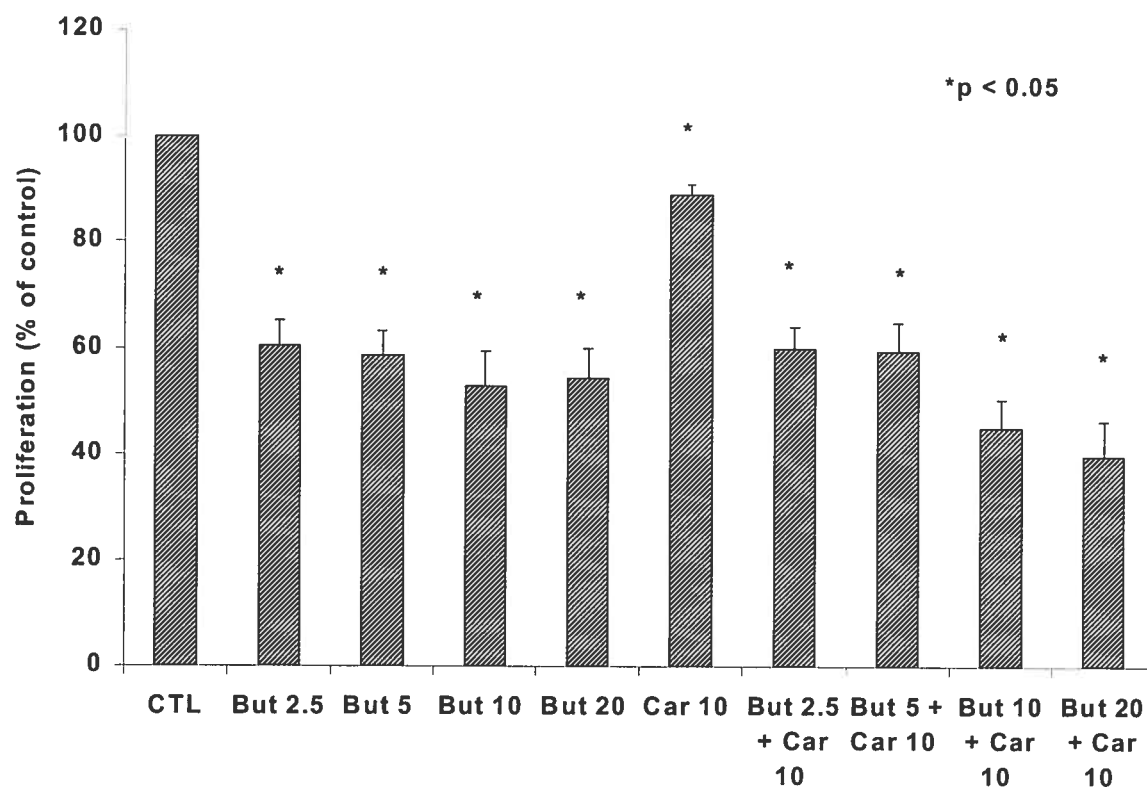
**Figure 3:** Effect of butyrate and carnitine on Caco-2 cell apoptosis. Following 48 hours of incubation in the absence (control) or the presence of butyrate, carnitine or butyrate conjugated with carnitine, apoptosis was quantified using the ApoStrand Elisa Apoptosis Kit. Results are expressed as % versus control (100%) and values represent mean  $\pm$  standard deviation for 6 experiments, each in duplicate. \* $p < 0.05$ .

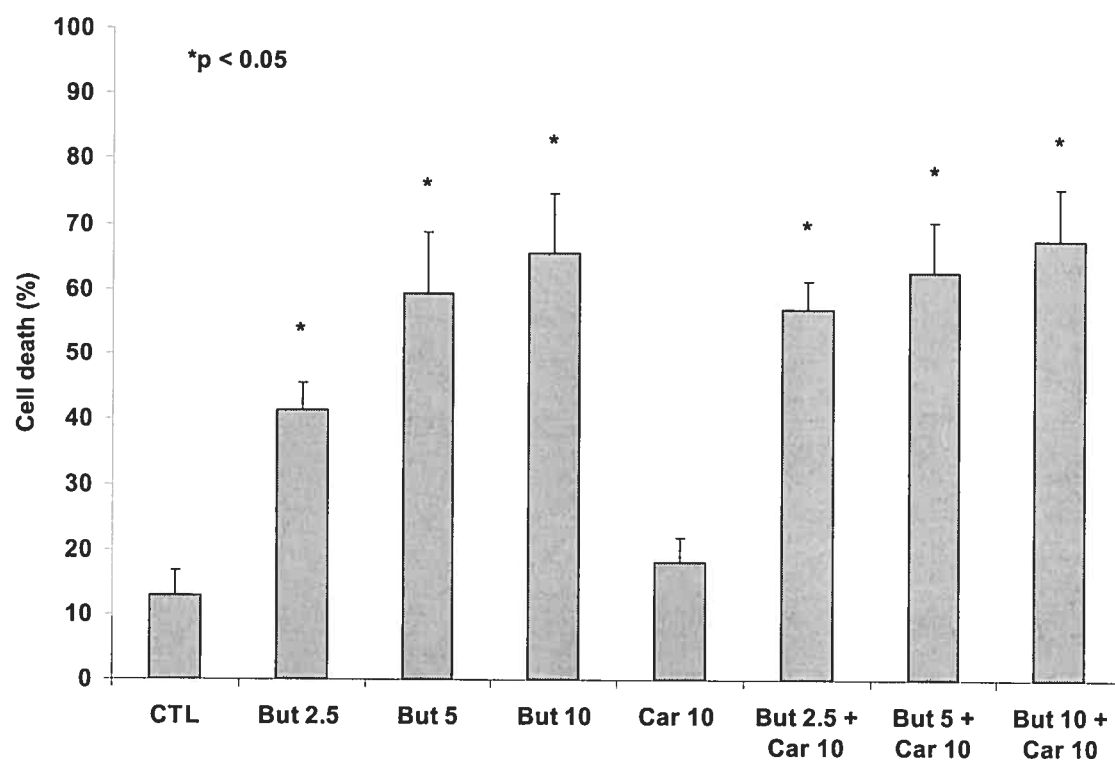
**Figure 4:** Effect of butyrate and carnitine on Caco-2 cell PGE<sub>2</sub> production. Caco-2 cells were treated with the absence (control) or the presence of the factors for 24 hours. PGE<sub>2</sub> was measured using the Prostaglandin E2 EIA Monoclonal Kit. Results are expressed as % versus control (100%) and values represent mean  $\pm$  standard deviation for 6 experiments, each in duplicate.

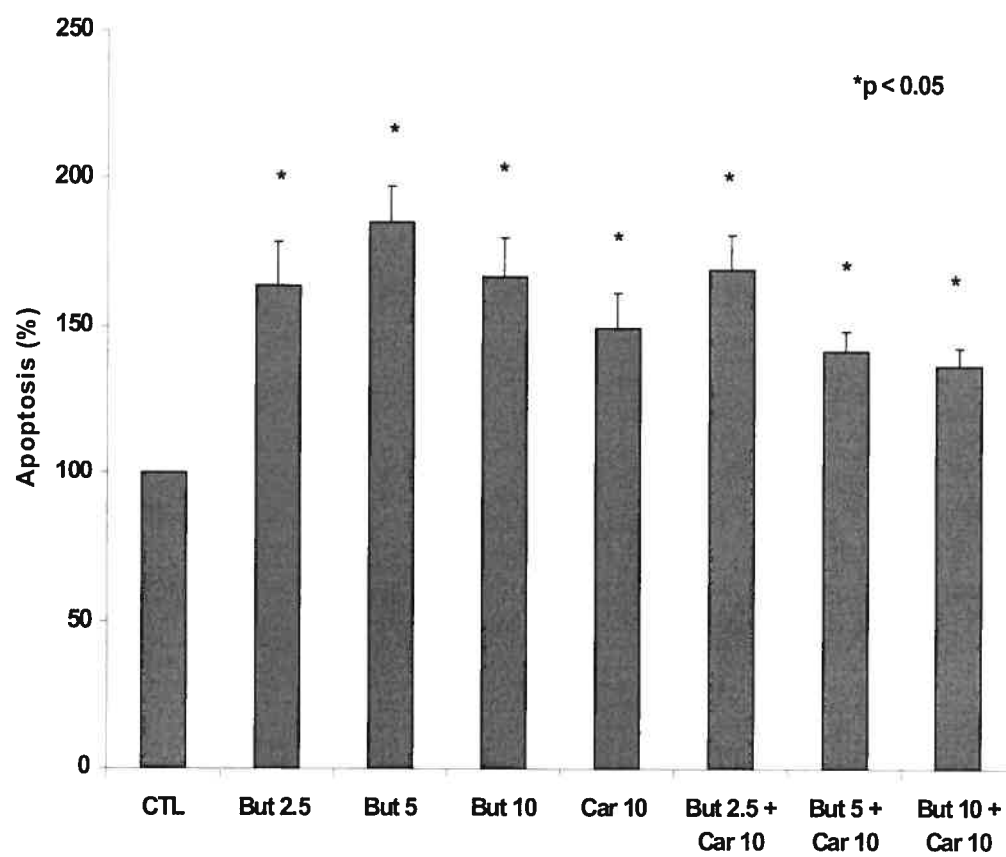
\*p<0.05.

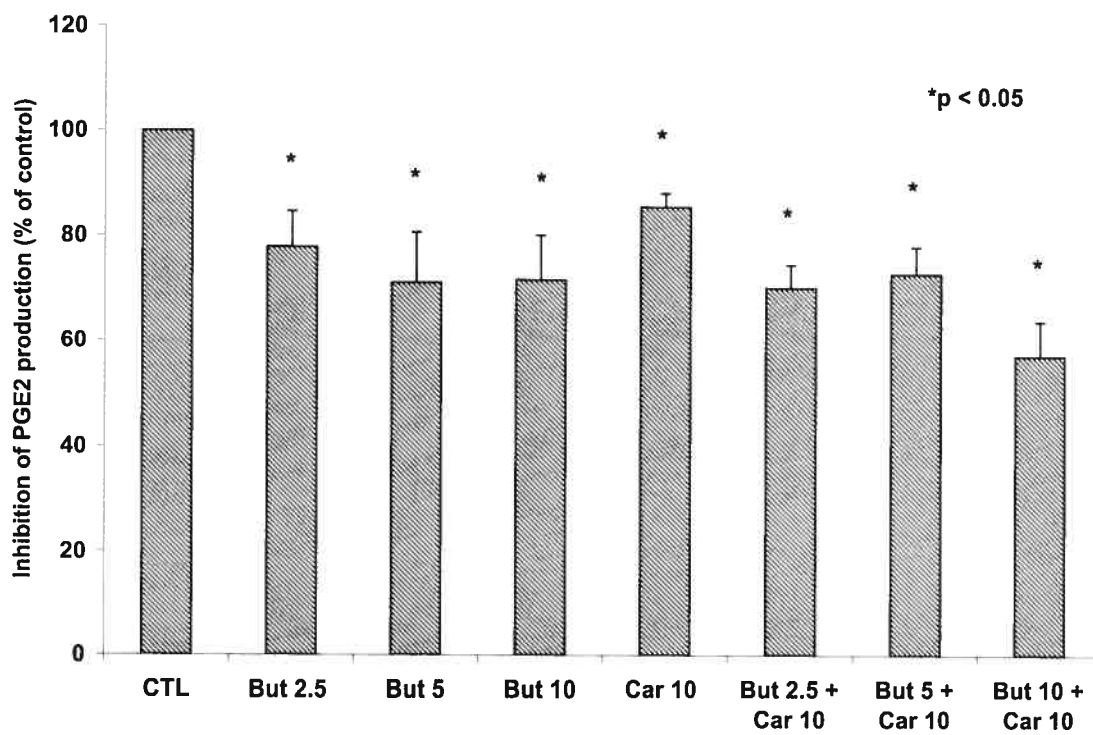
**Figure 5:** Effect of butyrate and carnitine on Caco-2 cell levels of pro- and anti-apoptotic Bcl-2 regulatory gene products. After 24 hours incubation in the absence (control) or the presence of butyrate and carnitine at physiological concentrations, cells lysates were analyzed by Western blotting for Bax, Bak, Bcl-x proteins and for COX-2 enzyme levels. Results shown illustrate one of four experiments.

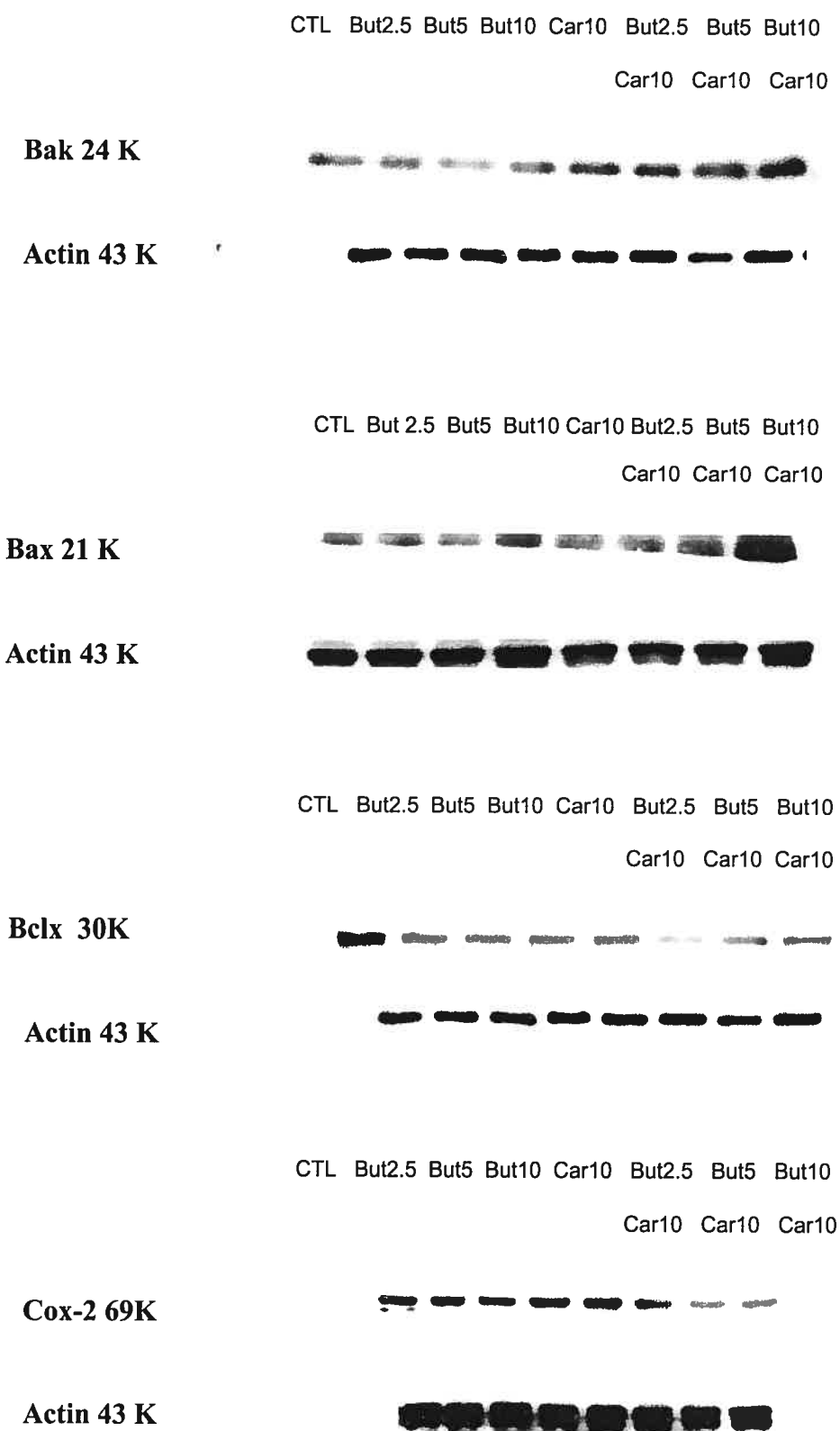


**Figure 1**

**Figure 2**

**Figure 3**

**Figure 4**

**Figure 5**

**INHIBITION OF INTESTINAL AND COLON CANCER DEVELOPMENT BY  
BUTYRATE AND CARNITINE**

Marie-Josée Roy<sup>1</sup>, Ihsan Elimrani<sup>2</sup>, Ijaz A Qureshi<sup>2</sup>,

Dittakavi R Sarma<sup>3</sup>, Ernest G Seidman<sup>1,2</sup>

Departments of Nutrition<sup>1</sup> and Pediatrics<sup>2</sup>

Research Center, Ste-Justine Hospital, University of Montreal

Department of Experimental Pathology<sup>3</sup>

University of Toronto

Running title: Anticarcinogenic effects of butyrate and carnitine

**Address for Correspondence:** Dr Ernest G Seidman

Chief, Division of Gastroenterology and Nutrition

Ste-Justine Hospital, 3175 Cote Ste-Catherine Rd.

Montreal, Quebec, H3T 1C5

Tel: 514-345-4626

Fax: 514-345-4999

[REDACTED]

## **ABSTRACT**

Epidemiological studies support a beneficial role of dairy product consumption in preventing colon cancer. Milk contains a number of anti-carcinogenic compounds, especially butyrate. However, *in vivo* studies have not consistently shown the anti-cancerous benefits of butyrate that have been observed using cell lines *in vitro*. Carnitine, an amino acid abundantly present in milk, can be conjugated with butyrate to enhance its bioavailability, and theoretically, its anticarcinogenic effects. In the present study, we tested the effects of butyrate alone and in combination with carnitine on the development of colon cancer *in vivo*. To examine this hypothesis, two mice models were used, a chemical carcinogen as an environmental model of colon cancer, and a genetic model (Min mouse). The latter mice have the same molecular defect of the APC gene present in humans with familial polyposis and colon cancer. C57B1/6J mice were treated with azoxymethane (AOM), a chemical carcinogen, weekly for four weeks. Subsequently, AOM and Min mice were divided into dietary groups containing different amounts of butyrate and carnitine. After 40 weeks for the AOM mice and 8 weeks for the Min mice, animals were sacrificed and their colons and intestines analyzed. Outcome parameters included microscopic and macroscopic cancerous lesions, colonic carnitine acetyltransferase activity (CAT) and acylcarnitine profiles. Our data indicate that carnitine and butyrate decreased the development of pre-cancerous lesions, macroscopic tumors on AOM mice and increased bioavailability of butyrate. Taken together, the data support a protective role for dietary intake of butyrate and carnitine against the development of colon tumors in an environmental model of colon carcinogenesis, but did not confer any benefits in the genetic Min model.

**KEYWORDS**

Butyrate, carnitine, colon cancer, azoxymethane, Min mouse



## **INTRODUCTION**

Epidemiological studies have strongly supported the role of diet for the risk of cancer in various populations (18). Consequently, there is considerable interest in approaching the war against cancer utilizing nutritional interventions (17,57). An increasing body of evidence has demonstrated that dairy products contain potent anticarcinogenic components, including short chain fatty acids such as butyrate and amino acids such as carnitine (45). Several reports have provided evidence that the relative risk of colorectal cancer was reduced significantly with a higher intake of dairy products. (9,55,61).

Butyrate is a short chain fatty acid abundant in bovine milk fat (7,5-13 mol/100ml), and is also produced by the microbial fermentation of dietary fibers, undigested starch and proteins (45). Short chain fatty acids such as butyrate play an essential role in maintaining colonic epithelial cell integrity and metabolism. It also able to inhibit DNA synthesis and cell growth in colon cancer cell lines (2,3,4,60) and paradoxically, stimulates proliferation in normal colonocytes (21,64). Butyrate also induces differentiation and apoptosis in colonic tumor cell lines by DNA fragmentation (19,20,22) and by inhibiting pro-oncogene expression. (11,31,56). At the molecular level, butyrate influences cellular DNA through hypermethylation, histone hyperacetylation and phosphorylation (8,12).

Despite evidence from a number of in vitro studies that butyrate can be a potent anticarcinogenic agent, in vivo studies have generally failed to show conclusive results (13,15,34,64). An exception to that are studies showing that intravenous or intracecal infusions of butyrate had significant anti-tumor effects in a murine model of metastatic colon cancer (14,38). Explanations for the relative lack of benefit of butyrate in vivo include its rapid absorption all along the gastrointestinal tract, its short half-life (39) and the deficiency of carnitine induced by butyrate supplementation (10,50), a condition related to

tumor incidence (46). To overcome these metabolic consequences, we aimed in this project to conjugate butyrate with carnitine by dietary supplementation. This reversible reaction is catalyzed by carnitine acetyltransferase, an enzyme present in the small intestinal and colonic mucosa (46). The conjugation of butyryl-CoA with carnitine to form butyryl-carnitine would theoretically improve the *in vivo* half-life of ingested butyrate, cellular bioavailability, and simultaneously prevent low carnitine levels.

Carnitine is a non-essential amino acid present in foods of animal origin. Cow's milk is a good source, containing 150-200 nmoles/ml (47,51). L-Carnitine modulates substrate flux and energy balance across cell membranes by regulating the transport of long-chain fatty acids into mitochondria and their subsequent  $\beta$ -oxidation and energy production. Acyl-coenzyme A is transformed into the intermembrane space and exchanged with carnitine to yield acylcarnitine. Transport of acylcarnitine through the inner membrane is followed by acyltransfer back to coenzyme A and initiation of oxidation (46). Carnitine can be conjugated with medium and short chain fatty acids, thereby enhancing their half-life and consequently, increasing their beneficial effects.

In order to verify our hypothesis, we employed two *in vivo* models of colon cancer. The first 'environmental' model involved C57BL/6J normal mouse that develop colon cancer after exposure to a chemical carcinogen, azoxymethane. The second, 'genetic' model employed the C57BL/6J-Min (multiple intestinal neoplasia) mouse that carries a nonsense mutation in codon 850 of the murine APC gene that is the homologue of the human adenomatous polyposis coli (APC) gene (58). The Min mice model is of particular interest as the gene defect in these animals corresponds to the same one present in humans genetically predisposed to familial polyposis, as well as those with spontaneous somatic mutations (28,42). The overall aim of this research project was to evaluate the potential

anticarcinogenic properties of combining carnitine and butyrate using these two different models of colon cancer in parallel.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

Male six week old C57BL/6J (normal) and C57BL/6J-Min mice were obtained from Jackson Laboratories, (Bar Harbor, Me) the normal (14-18 per group) and Min mice (8-9 per group) were acclimatized for a week prior to their use. Azoxymethane, was subsequently administered to the normal mice (8mg/kg/10ml i.p.) weekly for four consecutive weeks. The Min model is a congenic derivative of the same normal C57BL/6J mice is highly susceptible to spontaneous intestinal adenoma formation. After four weeks for AOM treated and one week for the Min mice, animals were divided into specific dietary groups, as defined below.

### **Diets**

The AOM mice were randomized into four dietary groups. Control animals, or group 1, received the basal diet, containing 7 % soy oil. Group 2 mice received the AIN-93 diet supplemented with 15 % safflower oil, while group 3 received the higher butyrate intake by way of supplementation with 15 % butterfat. Finally, group 4 had the AIN-93 supplemented with both 15 % butterfat and 0.08 % carnitine.

For the second model, Min mice were randomly divided into one of three dietary groups. Animals in group 1 were fed AIN-93 (7 % soy oil) supplemented with 15 % safflower, group 2 were fed AIN-93 diet supplemented with 15 % butterfat and group 3 AIN-93 supplemented with 13.5 % butterfat, 1.5 % butyrate and 0.08 % of carnitine (twice the amount present in milk solids). The composition of the various diets is detailed in Table 1. These diets, devoid of any supplemental antioxidants, were prepared weekly to prevent

lipid oxidation. All food portions were individually weighed and changed twice a week, and the mice were weighed at weekly intervals.

### **In vivo experiments**

After 40 weeks of experimental dietary exposure, AOM mice were sacrificed in a Co<sub>2</sub> chamber. The Min mice were killed in the same way after 8 weeks. The colons and small bowels were then removed and flushed with 0.9 % saline, sliced longitudinally and fixed in formaldehyde. The tissues were stained with 0.2 % methylene blue. After tissue preparation, colons and intestines were analyzed for microscopic pre-cancerous lesions (aberrant crypt foci, ACF), for crypt multiplicity, and for macroscopic lesions (polyps and adenomas). ACFs were identified from normal crypts by viewing the bowel tissue mucosal side up using a light microscope at a magnification of 10X, according to the protocol established by Bird et al (5,6,44). This protocol uses criteria, which included an increase in size, thicker epithelial cell lining, an increased pericryptal zone relative to normal crypts, and an elongated luminal opening (66). Polyps and adenocarcinomas were identified using established criteria (36,48).

### **Determination of carnitine levels**

Free, short, medium and long acylcarnitine profiles were estimated in intestinal and colonic tissues according to the method of Hoppel, as previously described (40). Tissues were homogenized in perchloric acid 3 % and the homogenates were centrifuged at 3500 rpm for two minutes. The supernatants were then treated with 2M bicarbonate to determine free carnitine levels. The pellet was stabilized in KOH (1N) to determine long chain acetylcarnitine. After a series of centrifugations and incubations, <sup>14</sup>acetyl-CoA (1mM) and

carnitine acetyltransferase (CAT) were added at 0.5mg/ml. CAT converts tissue carnitine and  $^{14}$ acetyl-CoA into radioactive acetylcarnitine, which is separated from CoA on a column of Dowex 1X-8. The radioactivity is then measured by liquid scintillation. The determined acetylcarnitine reflects the quantity of total carnitine. The percentage of tissue carnitine is expressed as nmol/mg protein. The determination of protein levels was done as described by Lowry et al (33).

#### **Determination of carnitine acetyltransferase activity (CAT)**

Colonic CAT activity was assayed by the radioenzymatic method described by Kalaria and Harik (26). The tissue was isolated and homogenized in sodium phosphate buffer, pH 7,0 containing 0,025 % of Triton X-100. After centrifugation at 1000 rpm for five minutes, the incubation medium (20 $\mu$ l of 10mM phosphate buffer at pH 7, 0.5mM EDTA, 150mM NaCL, 2mM L-carnitine, 1mM eserine salicylate, 0.4mM  $^{14}$  C-acetyl-CoA) was added to 25 $\mu$ l of the homogenate. After an incubation period of 10 min. at 37°C, the tubes were placed on ice to interrupt the reaction. Subsequently, 5ml of 10mM phosphate buffer containing 50mg/l of acetylcarnitine was added, followed by 2ml of acetonitril containing 1.5% tetraphenyl borate. Radioactivity was measured by liquid scintillation. Tissue CAT activity was expressed as nmoles of produced acetylcarnitine per mg tissue protein per minute. The determination of protein levels was done as described by Lowry et al (33).

### **Statistical analysis**

All experiments were performed in duplicate and were repeated at least four times. Values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation and were analyzed by ANOVA, followed by Student's t-test of significance, set at 5% ( $p < 0.05$ ), at 1% ( $p < 0.01$ ) or at 0.1% ( $p < 0.001$ ) for comparison of pairs of groups.

## **RESULTS**

### **Aberrant crypt foci, crypt multiplicity and macroscopic lesions**

In order to elucidate the effect of the butyrate present in the butterfat containing diet or combined with carnitine on the development of pre-cancerous lesions and progression towards macroscopic tumors, AOM mice were fed with one of four different specific diets for 40 weeks, as described above. As illustrated in Figure 1a, AOM mice in the group 3 (AIN + 15 % butterfat) developed significantly ( $p < 0.05$ ) more aberrant crypts than AOM mice in the control group. On the other hand, a highly significant ( $p < 0.001$ ) inhibitory effect on ACFs development was observed for the mice in group 4 whose diet included carnitine supplementation in combination with the butterfat. These mice also had significantly less crypt multiplicity compared to mice in groups 3 ( $p < 0.05$ ) and the control diet group 1 ( $p < 0.001$ ) (Figure 1b). There was a significantly ( $p < 0.05$ ) higher progression towards macroscopic lesions among AOM mice in the third, butterfat supplemented dietary group compared to mice in the control group (Figure 1c). On the other hand, mice in the fourth dietary group had significantly ( $p < 0.001$ ) less macroscopic tumor lesions compared to mice in the third group. Our data clearly indicate that carnitine supplementation had beneficial effects by decreasing tumors development on AOM mice .

Min mice were fed one of three different diets for 8 weeks, as detailed in the Methods section. No significant differences were observed in the development of intestinal adenomas (Figure 2a), ACF, crypt multiplicity or macroscopic lesions, among the three dietary groups. Min mice in the second diet group that received. AIN + 15 % butterfat had significantly ( $p < 0.05$ ) smaller sizes of intestinal tumors compared to Min mice fed AIN + 15% safflower (Fig. 2b).



### **Colonic and intestinal tissue carnitine levels**

Tissue carnitine levels were determined in AOM and Min mice were fed with specific diets for 40 and 8 weeks, respectively. Concentrations of total and free carnitine were significantly ( $p<0.01$ ) increased for AOM mice in fourth dietary group 4 (AIN + 15 % butterfat + 0.08 % carnitine) compared to animals fed with control diet (Fig.3a). Min mice in the third dietary group (AIN + 13.5 % butterfat + 0.08 % carnitine + 1.5 % butyrate), was also had significantly higher levels of free carnitine ( $p<0.05$ ) as well as short and medium acylcarnitine ( $p<0.01$ ), compared to mice fed the first diet containing safflower oil. A significant ( $p<0.01$ ) increase of long chain acylcarnitine was observed for animals receiving the third, carnitine supplemented diet in comparison with mice in the other two groups.

### **CAT activity in colonic and intestinal tissue**

In keeping with the previous data, dietary carnitine supplementation also resulted in a significantly ( $p<0.001$ ) higher intestinal carnitine acyltransferase activity in Min mice compared to those who received a high fat diet (safflower or butterfat) without carnitine (Figure 4b). As illustrated figure 4a, diet supplemented with carnitine did not modify carnitine acetyltransferase activity in AOM mice. However, a significant ( $p<0.05$ ) depletion in CAT activity was observed for AOM animals fed a high butterfat diet.

## **DISCUSSION**

Temporal trends and migrant studies have indicated that the etiology of colorectal cancer is predominantly environmental and hence, potentially modifiable (54). In fact, numerous prospective and case-control studies have shown an association between diet and colon cancer (30). A number of studies have clearly demonstrated that dairy products contain anticarcinogenic agents such as butyrate (45,55,63) and others lipids (25,65).

The present study supports a protective role for the consumption of milk and other dairy products in inhibiting tumor development and the progression towards macroscopic lesions in vivo using the AOM experimental model. Unlike the study demonstrating a benefit of lactoferrin (62), we did not observe a benefit of the experimental diets in the genetic Min model of colorectal cancer. For our experiments, we selected to study the effects of butyrate and carnitine as dietary factors. Butyrate, the preferred short-chain fatty acid energy source for colonic epithelial cells, has the remarkable capacity to inhibit the preneoplastic hyperproliferation induced by some tumor promoters in vitro (2,3). Also, butyrate is capable of increasing apoptosis in a number of cancer cell lines (4,19,22), with a stronger effect than observed with propionate or valerate (53). The dietary component tested, carnitine, is an amino acid playing a main role in the metabolism of fatty acids. Also, carnitine is considered to be an anti-oxidant and anticarcinogenic nutrient (1,7,46). Moreover, carnitine is able to improve the short-life of butyrate (37) and thus theoretically enhance its beneficial effects. In our experiments, we selected specific dietary groups to examine the effect of high fat diets (safflower oil or butterfat) with or without carnitine supplementation on colon cancer development. This was based on previous studies that have demonstrated that high fat, Western style diets increase colonic and intestinal tumors in mice (23,32).

AOM was selected to induce colon cancer as multiple injections had been shown to result in a greater multiplicity and a higher incidence of tumors at an earlier time point (36). This chemical carcinogen model of colon cancer is a well-established and is relevant, as the majority of humans with colonic neoplasia do not carry the APC gene (16). On the other hand, the Min mouse provides a powerful model to study the role of the APC gene in the progression of intestinal and mammary tumorigenesis (41,59). Indeed, it is useful to verify the influence of environmental factors on critical events in APC driven tumorigenesis (43).

Our results indicate that the addition of carnitine to a high butterfat diet is particularly effective in inhibiting the development of preneoplastic ACF. It also decreased the development of crypt multiplicity and moreover inhibited the formation of macroscopic lesion in the AOM model. Our data are consistent with other studies in the literature showing a benefit of dairy products, because milk fat contains an abundant quantity of butyrate and carnitine. Studies have demonstrated that butyrate arrests the growth of neoplastic colonocytes *in vivo* and inhibits preneoplastic hyperproliferation (38) by down-regulating pro-oncogene expression (11,31,56). Carnitine supplementation likely provided benefit primarily by enhancing the half-life of butyrate (37), improving its bioavailability (availability for tissue) and preventing secondary metabolic effects (10,50). In fact, bioavailability of butyrate was increased, because our *in vivo* animal studies have shown that supplementation of carnitine orally results in increased tissue stores of butyryl-carnitine (acyl-carnitine) in the colonic mucosa. Furthermore, carnitine is an amino acid with anti-oxidant and anti-carcinogenic effects *in vivo* and *in vitro* (1,7,46), able to increase the induction of apoptosis by dietary fatty acids (29). For all these reasons, carnitine was likely able to enhance the anticarcinogenic effects of butyrate in AOM treated mice.

However, we did not observe any major dietary effects using the Min model. Our data suggest that dietary factors for colon cancer prevention are typically associated with a lower overall risk and may be a less effective intervention against colon cancer in models that are highly susceptible to develop cancer (52). These results seem to be in contradiction with some other studies that have already shown dietary influences using the Min model (23,32,62). This discrepancy may be due to other experimental conditions, such as the limited time of exposure to the diet, the relatively small number of Min mice studied per group, the composition of the diet and other experimental differences. We did find that the high milk fat diet without carnitine reduced the size of intestinal tumors and there was also this same tendency for Min mice fed with diet supplemented by carnitine. These results are consistent with the ability of butyrate to regulate cancer growth (2,3,60) and to diminish average tumor diameter in vivo (45).

Our data confirm that the administration of L-Carnitine increases intestinal carnitine levels as had been observed in the brain in rats (35), in the liver in mice (48) and in the plasma of human infants (50). We also investigated the activity of intestinal CAT. In the AOM model, our results show that CAT activity was depleted in concert with tissue stores when animals were fed a high milk fat diet. The activity of this enzyme was restored to normal in carnitine supplemented animals. One previous study also observed enhanced CAT activity in rats fed dietary L-Carnitine (27) but no previous study examined the importance of this enzyme in the context of cancer. CAT is an important enzyme, implicated in oxidative metabolism (1,7,46), in modulating the bioavailability of butyrate, and in maintaining cell metabolism (24,49).

In summary, the present study has demonstrated the significant colon tumor preventive benefits afforded by carnitine supplementation in high fat diets. Mice receiving dietary carnitine supplementation developed fewer preneoplastic and tumor lesions when exposed to a chemical carcinogen. It also increased the bioavailability of butyrate *in vivo*, potentially explaining, in part, the beneficial effect. As opposed to this environmental model of colon cancer, the dietary supplementation of carnitine to a high fat diet afforded no significant benefit to mice genetically at high risk of colonic neoplasia. In future experiments, it will be interesting to investigate the molecular mechanisms by which butyrate and carnitine inhibit colon cancer *in vivo*.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was supported by a research grant from the Dairy Farmers of Canada (EGS). The authors wish to thank Sylvie Marineau for secretarial assistance. This work constitutes a part of Marie-Josée Roy's MSc thesis for the Department of Nutrition, University of Montreal.

## **REFERENCES**

1. Ames BN. Micronutriments prevent cancer and delay aging. *Toxicology Lett* 102-103: 5-8, 1998.
2. Archer S, Meng S, Johnson WJ, Tang R, Hodin R. Butyrate inhibits colon carcinoma cell growth through two distinct pathways. *Surgery* 124: 248-253, 1998.
3. Barnard JA, Warwick G. Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT29 cells. *Cell Growth Differ* 4: 495-501, 1993.
4. Basson MD, Turowski GA, Rashid Z, Hong F, Madri JA. Regulation of human colonic cell line proliferation and phenotype by sodium butyrate. *Dig Dis Sci* 41: 1986-1993, 1996.
5. Bird RP. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: Preliminary finding. *Cancer Lett* 37: 147-151, 1987.
6. Bird RP. Role of aberrant crypt foci in understanding pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett* 93: 55-71, 1995.
7. Boerrigte ME, Franceschi C, Arrigoni-Martelli E, Wei JY, Vijg J. The effect of L-carnitine and acyl-L-carnitine on the disappearance of DNA single strand breaks in human peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis* 14: 2131-2136, 1993.
8. Boffa LC, Vidali G, Mann RS, Allfrey VG. Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate. *J Biol Chem* 254: 4383-4390, 1979.
9. Bostick RM. Diet and nutrition in the etiology and primary prevention of colon cancer. In: Bendich A, Deckelbaum RJ, and Eds. *Preventive nutrition: the comprehensive guide for health professionals*. Totowa, Humana Press, 57-95, 1997.

10. Chalmers RA, Roc CR, Stacey TE, Hoppel CL. Urinary excretion of L-carnitine and acylcarnitine by patients with disorders of organic acid metabolism: Evidence for secondary insufficiency of L-carnitine. *Pediatr Res* 18: 1325-1328, 1984.
11. Chapkin RS, Fan YY, Lupton JR. Effect of diet on colonic-programmed cell death: molecular mechanism of action. *Toxicology Lett* 112-113: 411-414, 2000.
12. De Hann JB, Gevers W, Parker MI. Effects of sodium butyrate on the synthesis and methylation of DNA in normal cells and their transformed counterparts. *Cancer Res* 46(2): 713-716, 1986.
13. Deshner EE, Ruperto JF, Lupton RJ, Newmark HL. Dietary butyrate (tributyrin) does not enhance AOM-induced colon tumorigenesis. *Cancer Lett* 52: 79-82, 1990.
14. Dolora P, Cademi G, Luceri C, Tessitore L. Slow releases pellets of sodium butyrate increase apoptosis in the colon rats treated with azoxymethane. *Proc Mer Assoc Cancer Res* 39: 197, 1998 (abstract).
15. Freeman HJ. Effects of differing concentrations of sodium butyrate on 1,2 dimethyldrazine induced rat intestine neoplasia. *Gastroenterology* 91: 596-602, 1986
16. Friedl W, Caspari R, Sengteller M, Uhlhaas S, Lamberti C, Jungck M, Kadmon M, Wolf M, Fahnenstich J, Gebert J, Möslin G, Mangold E, Propping P. Can APC mutation analysis contribute to therapeutic decisions on familial adenomatous polyposis? Experience from 680 FAP families. *Gut* 48: 515-521, 2001.
17. Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Willet WC. Intake of fat, meat and fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer Res* 54: 2390-2397, 1994.
18. Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz G, Rimm EB, Willet WC. Relationship of diet to risk of colorectal adenoma in man. *J Natl Cancer Inst* 84: 91-98, 1992.



19. Hague A, Manning AM, Hanlon KA, Huschtscha L, Hart D, Paraskeva C. Sodium butyrate induces apoptosis in a human colonic tumor cell lines in a p-52 independent pathway-implications for the possible role of dietary fibers in the prevention of large bowel cancer. *Int J Cancer* 55: 489-505, 1993.
20. Hague A, Paraskeva C. The short-chain fatty acid butyrate induces apoptosis in colorectal tumor cell lines. *Eur J cancer Prev* 4: 359-364, 1995.
21. Hassig CA, Tong JK, Schreiber SL. Fiber-derived butyrate and the prevention of colon cancer. *Chem Biol* 4:783-89. 1997.
22. Heerdt BG, Houston MA, Augenlicht LH. Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer Res* 54: 3288-3293, 1994.
23. Hioki K, Shivapurkar N, Oshima H, Alabaster O, Oshima M, Taketo MM. Suppression of intestinal polyp development by low-fat and high fiber diet in Apc<sup>Δ716</sup> knockout mice. *Carcinogenesis* 18: 1863-1865, 1997.
24. Inverdi C, Tonazzi A, Palmieri F. Characterisation of the unidirectional transport carnitine catalyzed by the reconstituted carnitine carrier from rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Acta* 1069: 110-116, 1991.
25. Järvinen R, Knekt P, Hakulinen T, Aromaa A. Prospective study on milk products, calcium and cancers of the colon and rectum. *Eur J Clin Nutr* 55: 1000-1007, 2001.
26. Kalaria RN, Harik SI. Carnitine acetyltransferase activity in the human brain and its microvessels is decrease in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 32: 583-586, 1992.
27. Karlic H, Lohninger S, Koeck T, Lohninger A. Dietary L-carnitine stimulates carnitine acyltransferase in the liver of aged rats. *J Histochem Cytochem* 50: 205-212, 2002.

28. Kinzler KW, Nilbut MC, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KT, Preisinger A C, Hamilton SR, Hedge P, Markham A. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 251: 1366-1370, 1991.
29. Kong JY, Rabbin SW. Palmitate-induced cardiac apoptosis is mediated through CPT-1 but not influenced by glucose and insulin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: 717-725, 2002.
30. Le Marchand L, Wilkens LK, Hankin JH, Kolonel LN, Lyu LC. A case-control study of diet and colorectal cancer in a multi-ethnic population in Hawaii (United States) lipids and food of animal origin. *Cancer Cause Control* 8: 637-648, 1997.
31. Litvak DA, Evers BM, Hwang KO, Hellmich MR, Ko TC, Townsend Jr CM. Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells is associated with apoptosis and early induction of p21<sup>Waf1/Cip1</sup> and p27<sup>Kip1</sup>. *Surgery* 124: 161-169, 1998.
32. Lipkin M. New rodent models for studies of chemopreventive agents. *J Cell Bioch* 28-29 (Suppl): 144-47, 1997
33. Lowry O, Rosenrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 265-274, 1951.
34. Lupton JR. Butyrate and colonic cytokinetics; differencies between in vitro and in vivo studies. *Eur J Cancer Prev* 4: 373-78, 1995.
35. Maccari F, Arseni A, Chiodi P, Ramacci MT, Angelucci L. Levels of carnitine in brain and other tissues of different stages: effect of acetyl-L-carnitine administration. *Exp Gerontol* 25: 127-134, 1990.
36. Magnuson BA, Shirliff N, Bird RP. Resistance of aberrant crypt foci to apoptosis induced by azoxymethane in rats chronically fed cholic acid. *Carcinogenesis* 15: 1459-1462, 1994.

37. Marx G, Lannes M, Dionne S, Levy E, Qureshi I, Levesque D, Seidman EG. Effects of butyrate conjugated linoleic acid and carnitine on Caco-2 cell proliferation and apoptosis. Presented DDW 101<sup>st</sup> Annual Meeting of the AGA. San Diego, CA, May 2000. *Gastroenterology* 188: A-550, 2000.
38. Medina V, Afonso JJ, Alvarez-Arguelles H, Hernandez C, Gonzalez F. Sodium Butyrate inhibits carcinoma development in a 1,2 dimethylhydrazine-induced rat colon cancer. *JPEN* 22: 14-17, 1998.
39. Miller AA, Kurschel E, Osieka R, Schmidt CG. Clinical pharmacology of sodium butyrate in patients with acute leukemia. *Eur J Cancer Clin Oncol* 23: 1283-1287, 1987.
40. Minkler PE, Hoppel CL. Determination of free carnitine and total carnitine in human urine: derivitization with 4-bromophenylacetyl trifluoromethane sulfonate and high performance liquid chromatography. *Clin Chim Acta* 212: 55-64, 1992.
41. Moser AR, Luongo C, Gould KA, Mcneley MK, Shoemaker AK, Dove WF. Apc<sup>min</sup>: A mouse model for intestinal and mammary tumorigenesis. *Eur J Cancer* 31: 1061-1064, 1995.
42. Nishisho I, Nakamura Y, Migoshi Y, Mihi Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hedge P. Mutation of chromosome 5q21 gene FAP and colorectal cancer patients, *Science* 253: 665-669, 1991.
43. Parelsen JE. Modulation by dietary factors in murine FAP models. *Toxicology Lett* 112-113: 403-409, 2000.
44. Paulsen JE, Namork E, Steffensen IL, Eide TJ, Alexander J. Identification and quantification of aberrant crypt foci in the colon of Min mice-a murine model of familial adenomatous polyposis. *Scand J Gastroenterol* 35: 534-539, 2000.

45. Parodi PW. Cow's milk fat component as potential anticarcinogenic agent. *J Nutr* 127: 1055-1060, 1997.
46. Peluso G, Nicolai R, Reda E, Benatti P, Barbarisi A, Calvani M. Cancer and anti-cancer therapy-induced modifications on metabolism mediated by carnitine system. *J Cell Physiol* 182: 339-350, 2000.
47. Penn D, Dalderer M, Schmidt-Sommerfeld E. Carnitine concentrations in the milk of different species and infant formulas. *Biol Neonate* 52: 70-79, 1987.
48. Qureshi IA, Ratnakumari L, Michalak A, Giguère A, Cyr D, Butterworth RF. A profiles of cerebral and hepatic carnitine, ammonia and energy metabolism in a model of organic aciduria: BALB/cByJ mouse with short-chain Acyl-CoA deshydrogenase deficiency. *Bioch Med Met Biol* 50:145-158, 1993.
49. Ramsay RR. The carnitine acyltransferases: modulators of acyl-CoA dependent reactions. *Biochem Soc Trans* 28:182-186, 2000.
50. Rebouche CJ. Carnitine function and requirements during the life cycle. *FASEB J* 6: 3379-3386, 1992.
51. Sandor A, Pecsuvac K, Kerner J, Alkonyi I. On carnitine content of human breast milk. *Pediatric Res* 16: 89-91, 1982.
52. Sellers TA, Bazyk AE, Bostick RM, Kushi LH, Olsen JE, Anderson KE, Lazouich D, Folsom AR. Diet and risk of colon cancer in a large prospective study of older women: an analysis stratified on family history. *Cancer Cause Control* 9: 357-367, 1998.
53. Siavoshian S, Blottière HM, Le Foll E, Kaeffer B, Cherbut C, Galmiche JP. Comparison of the effect of different short chain fatty acid on the growth and differentiation of human colonic carcinoma cell lines. *Cell Biol Int* 21: 281-287, 1997.

54. Singh PN, Fraser GE. Dietary risk factors for colon cancer in a low-risk population. *Am J Epidemiol* 148: 761-774, 1999.
55. Slattery ML, Boucher KM, Caan BJ, Potter JD, Ma KN. Eating patterns and risk of colon cancer. *Am J Epidemiol* 148: 4-16, 1998.
56. Souleimani A, Asselin C. Regulation of c-fos expression by sodium butyrate in the human colon carcinoma cell line Caco-2. *Biochem Biophys Res Comm* 193: 330-336, 1993.
57. Sporn MB. The war on cancer. *Lancet* 347: 1377-81, 1996.
58. Su CK, Kinzler KW, Preisinger AC, Moser AR, Luongo C, Gould RA, Dove WF. Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homologue of the APC gene. *Science* 256: 668-670, 1992.
59. Thompson MB. The MIN mouse: A genetic model for intestinal carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 25: 329-332, 1997.
60. Toscani A, Soprano DR, Soprano KJ. Molecular analysis of sodium butyrate-induced growth arrest. *Oncogen Res* 3(3): 223-238, 1988.
61. Tsuda H, Sekine K, Ushida Y, Kuhara T, Takasuka N, Ligo M, Han BS, Moore MA. Milk and dairy products in cancer prevention: focus on bovine lactoferrine. *Mutat Res* 462: 227-231, 2000.
62. Ushida Y, Sekine K, Kuhara T, Takasuka N, Ligo M, Tsuda H. Inhibitory effects of bovine lactoferrine on intestinal polyposis in the Apc<sup>min</sup> mouse. *Cancer Lett* 134: 141-145, 1998.

63. Van Der Meer R, Lapré JA, Govers MJAP, Kleibeurer JH. Mechanisms of the intestinal effects of dietary fats and milk products on colon carcinogenesis. *Cancer Lett* 114: 75-83.1997.
64. Velazquez Oc, Lederer Hm, Rombeau JL. Butyrate and the colonocytes. Implications for neoplasia. *Dig Dis Sci* 41: 727-729, 1996.
65. Willowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr* 73(Suppl): 451S-455S, 2001.
66. Wyllie AH. Apoptosis and carcinogenesis. *Eur J Cell Biol* 73: 189-197, 1997.

## **FIGURE LEGENDS**

**Figure 1:** Effect of dietary interventions on aberrant crypt formation, crypt multiplicity and macroscopic lesions in AOM mice. Mice were fed by four different diets (14-18 mice/group) for 40 weeks (Figure 1 a,b,c). After preparation, ACFs and crypt multiplicity were identified from normal crypts by viewing the colons, mucosal side up, with a light microscope at a magnification of 10X using specific criteria. Otherwise, macroscopic lesions were identified using established criteria. Results are expressed as number of ACF, crypt multiplicity and macroscopic lesions per mouse in each diet group and values represent mean  $\pm$  standard deviation for 14-18 mice/group.

Figures 1 a,b,c: \* $p < 0,001$ , <sup>+</sup> $p < 0,05$

**Figure 2:** Effect of dietary interventions on adenoma formation and on the length intestinal tumors in Min mice. Mice were received three different diets (8-9 mice/group) for 8 weeks (Figure 2 a,b). After preparation, adenoma lesions were identified using established criteria and length tumors were measured. Results are expressed as number adenomas per mouse in each diet group (2a) and expressed as mm<sup>2</sup> (2b). Values represent mean  $\pm$  standard deviation for 8-9 mice/group.

Figure 2b: \* $p < 0,05$

**Figure 3:** Effect of dietary interventions on carnitine levels in AOM mice and in Min mice. After diet exposure, free, short, medium and long acylcarnitine profiles were estimated in AOM colonic tissues (Figure 3a) and in Min intestines (Figure 3b) by method of Hoppel.

Results are expressed as nmol/mg protein and values represent mean  $\pm$  standard deviation for 8 AOM mice/group and for 8-9 Min mice/group.

Fig. 3a: \* $p < 0.01$

Fig. 3b: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (Vs safflower)

Fig. 3b:  $^{++}p < 0.01$  (Vs butterfat)

**Figure 4:** Effect of dietary interventions on carnitine acetyltransferase activity (CAT) on AOM and Min mice. After 40 and 8 weeks on diet exposure respectively, CAT activity on AOM tissues (Figure 4a) and on Min tissues (Figure 4b) was assayed by the radioenzymatic method described by Kalaria and Harik. Results are expressed as nmol/mg protein/hr and values represent mean  $\pm$  standard deviation for 8 AOM mice/group and 8-9 Min mice/group.

Fig. 4a: \* $p < 0.05$

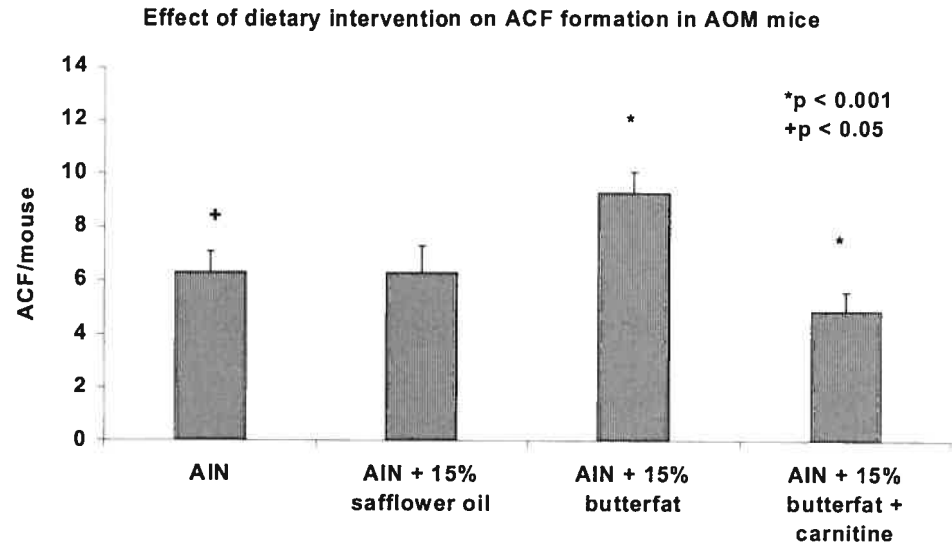
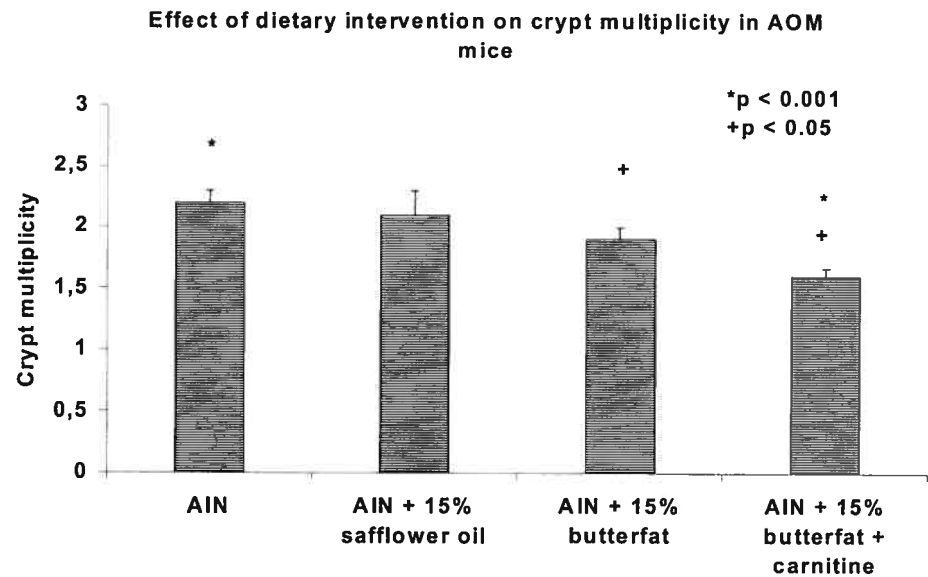
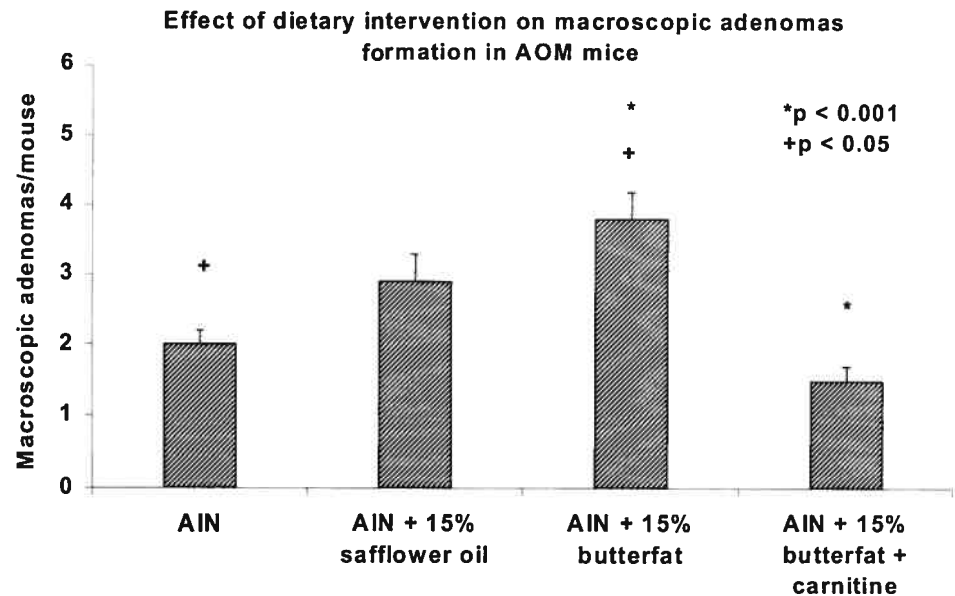
Fig. 4b: \*\*\* $p < 0.001$  (Vs safflower)

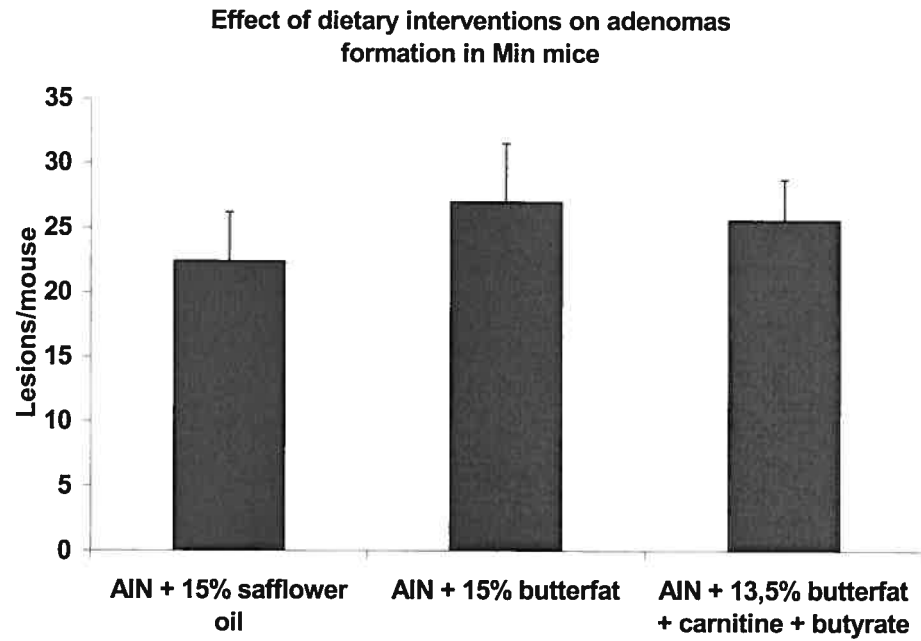
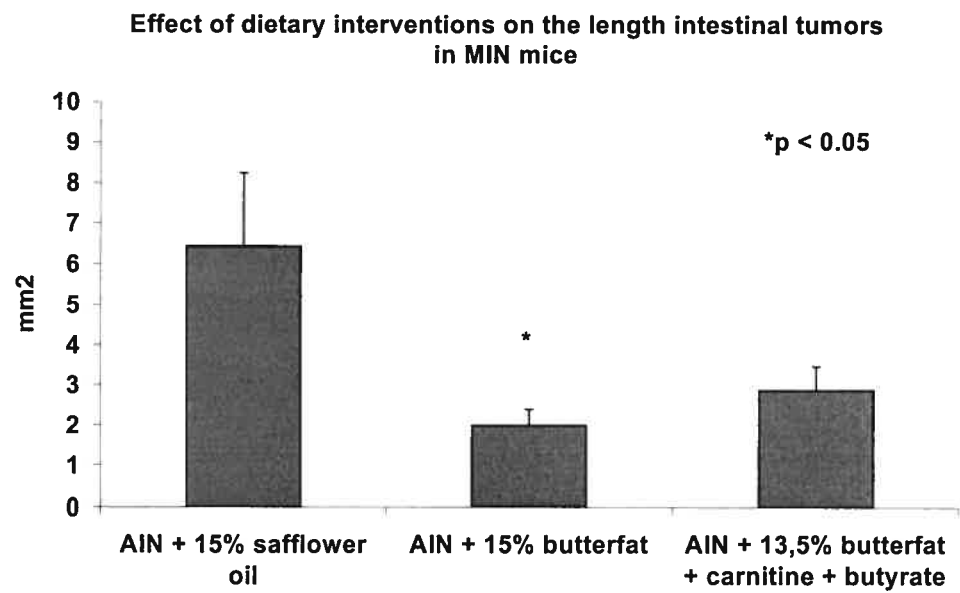
Fig. 4b:  $^{+++}p < 0.001$  (Vs butterfat)



**Table 1: Composition of diet groups**

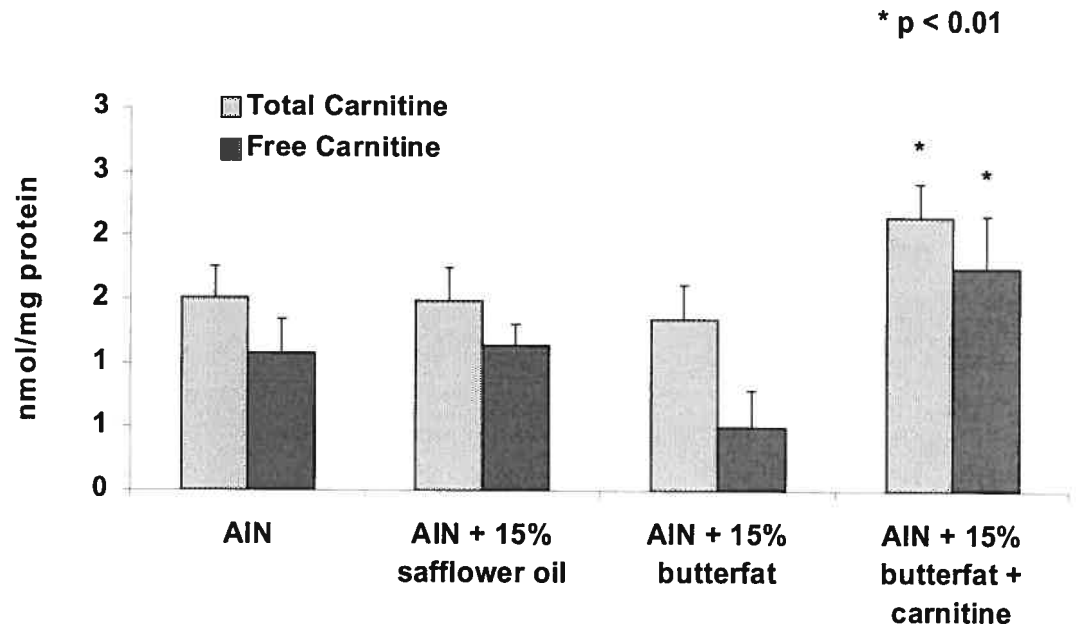
Components	Composition of diets			
	AIN-93	AIN + 15% safflower oil	AIN + 15% butterfat	AIN + 15% butterfat + 0.08% carnitine/ AIN +13,5% butterfat +0,08% carnitine +1,5%butyrate
Casein	200g	200g	200g	200g
Corn starch	398g	348g	348g	348g
Corn starch dextrinized	132g	132g	132g	132g
Sucrose	100g	X	X	X
Cellulose	50g	50g	50g	50g
Soybean oil	70g	70g	70g	70g
Mineral Mix	35g	35g	35g	35g
Vitamin Mix	10g	10g	10g	10g
Methionine	3g	3g	3g	3g
Choline Bitartrate	2.5g	2.5g	2.5g	2.5g
L-carnitine	X	X	X	0.8g
Safflower oil	X	150g	X	X
Butterfat	X	X	150g	150g/135g
Butyrate	X	X	X	X/15g

**Figure 1a****Figure 1b****Figure 1c**

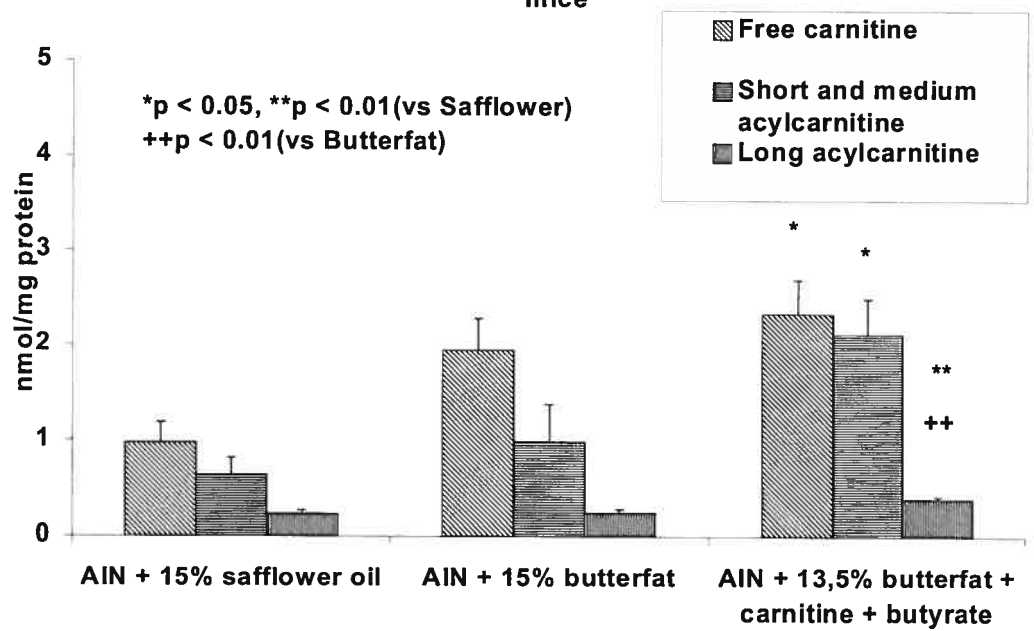
**Figure 2a****Figure 2b**

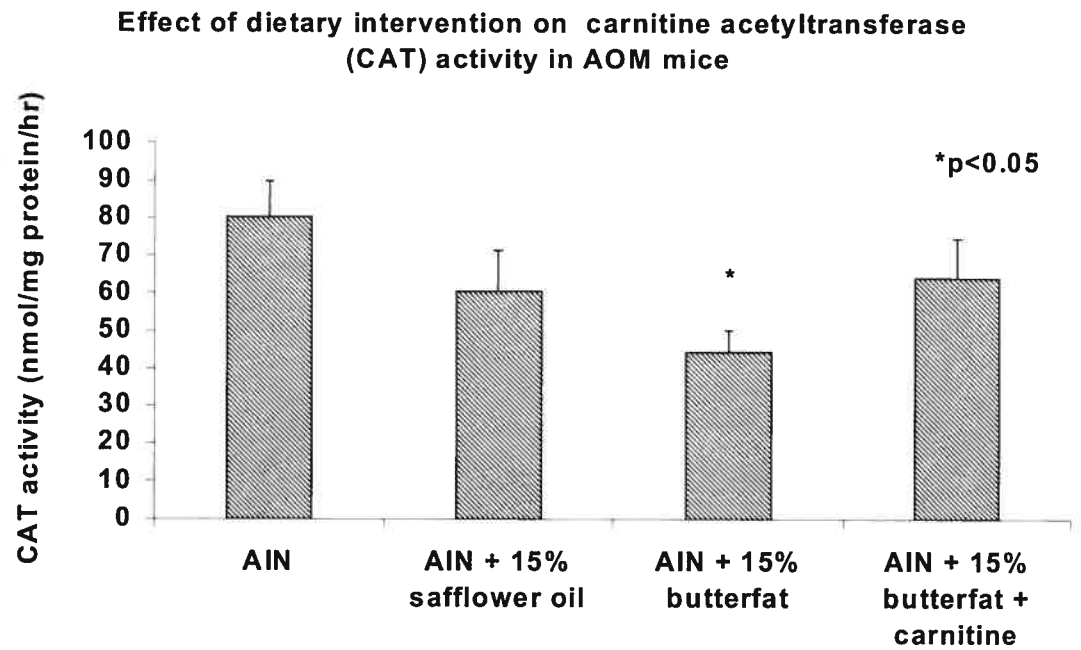
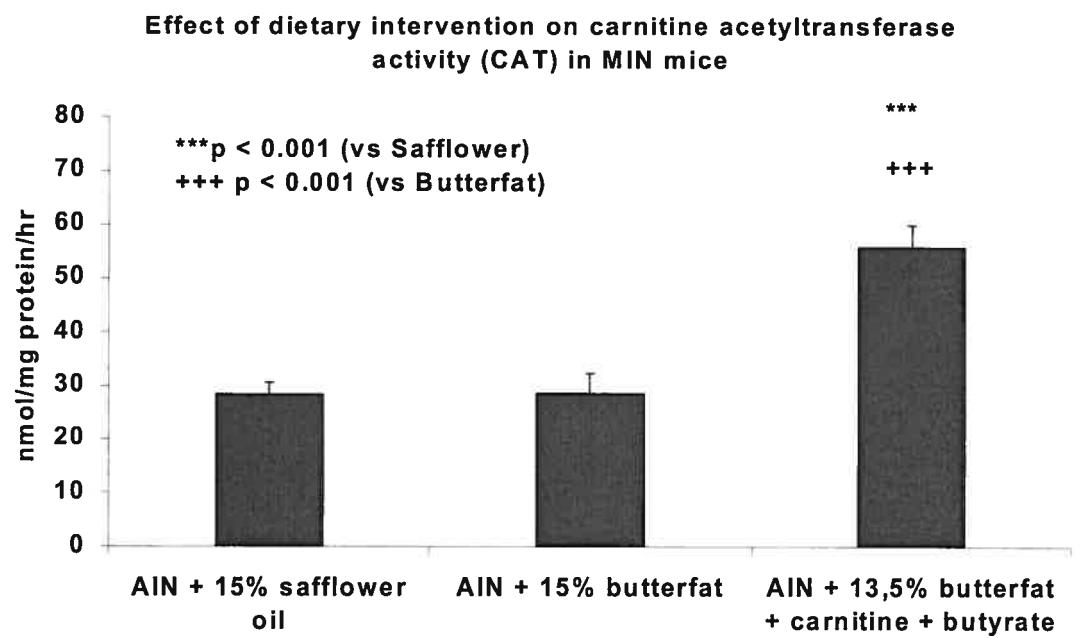
**Figure 3a**

Effect of dietary intervention on carnitine levels in AOM mice

**Figure 3b**

Effect of dietary interventions on levels of carnitine in MIN mice



**Figure 4a****Figure 4b**

## **DISCUSSION**

Les études épidémiologiques ont démontré à plusieurs reprises que le cancer est une maladie à étiologie multiple. En effet, des facteurs tels ceux d'ordre alimentaire jouent des rôles prépondérants sur l'incidence du cancer du côlon (7,11,12). Ces facteurs peuvent avoir des effets de protection ou à l'opposé, des effets incitatifs sur le développement du cancer colorectal et ce, en modulant les mécanismes impliqués. En effet, des études récentes ont montré que certaines composantes des produits laitiers ont des propriétés anticancéreuses, puisqu'elles sont capables de prévenir et d'inhiber le développement des tumeurs par différents mécanismes moléculaires assez peu connus (47,157). Ainsi, notre étude in vivo a démontré que la consommation de nutriments spécifiques comme le butyrate et la carnitine, est associée à une diminution du cancer du côlon induite par l'AOM, un carcinogène. Nos études in vitro avec les cellules cancéreuses Caco-2 suggèrent que ces nutriments sont anticancérigènes via l'inhibition de la prolifération et via l'induction de l'apoptose, et ce, par divers mécanismes moléculaires.

Pour effectuer nos expériences, nous avons choisi deux nutriments qui se retrouvent dans le lait, le butyrate et la carnitine, et ce, pour différentes raisons. Tout d'abord, le butyrate a été sélectionné, car cet acide gras à chaîne courte est la source principale d'énergie pour les cellules épithéliales du côlon. De plus, ce composé possède des propriétés remarquables quant à l'inhibition de la prolifération et à l'induction de l'apoptose dans un nombre important de lignées cellulaires (90,158,159,160,161). Toutefois, le butyrate n'est pas l'unique source d'énergie, puisque le propionate et le valérate sont tous les deux des acides gras également capables de fournir de l'énergie aux colonocytes et possèdent des propriétés bénéfiques très intéressantes, quoique moins spectaculaires que le butyrate (162). Le second composé utilisé pour nos expériences est la carnitine, un acide aminé aussi présent dans le lait. La carnitine a été sélectionnée puisque des études antérieures ont confirmé ses effets antioxydants et anticancérigènes (111,117,118). De plus, la carnitine, une fois conjuguée au butyrate par l'enzyme carnitine acétyltransférase, est capable d'améliorer la demi-vie du butyrate, sa

biodisponibilité cellulaire et par le fait même ses propriétés anticancérigènes. En effet, il est fort intéressant de combiner ces deux nutriments puisque bien que de nombreuses études in vitro ont pu confirmer l'effet bénéfique du butyrate, la plupart des études in vivo ont échoué dans ce sens en raison de la courte demi-vie du butyrate (113,114,115). Tel que mentionné ci haut, le butyrate et la carnitine sont deux composantes des produits laitiers, il aurait alors été très intéressant d'incuber les Caco-2 et de nourrir les souris directement avec du lait. Toutefois, il a été préférable de les isoler des autres composantes du lait afin de ne pas interférer ou de biaiser les résultats de notre étude. En effet, plusieurs études ont déjà démontré des effets bénéfiques sur le cancer de la vitamine D, du calcium, de l'acide linoléique conjuguée, de la sphingomyéline et des probiotiques, tous également présents dans le lait (47,48,65).

Pour nos expériences in vitro, nous avons utilisé la lignée cellulaire Caco-2 puisqu'il est un modèle du cancer du colon très bien établi (143). Ces cellules ont été incubées avec des concentrations de butyrate entre 2,5 mM et 20 mM, car des études précédentes ont démontré que les concentrations physiologiques retrouvées dans la lumière intestinale chez l'homme sont entre 10 et 30 mM (92,163). De ce fait, les doses ont donc été choisies en relation avec les quantités de butyrate retrouvées véritablement dans les vaisseaux et la muqueuse intestinale. En ce qui concerne la carnitine, les cellules ont été traitées avec 10 mM, puisque cette concentration est considérée physiologique pour l'être humain (105). Finalement, pour la grande majorité de nos expériences in vitro, un temps d'incubation de 48 heures a été sélectionné, car des études précédentes effectuées dans notre laboratoire ont montré que l'incubation des Caco-2 avec le butyrate et la carnitine à des doses physiologiques pour une période inférieure à 48 heures, a peu d'effets sur l'inhibition de la prolifération.

Nos premières expériences sur la prolifération cellulaire ont montré que l'incubation des cellules avec du butyrate seulement est particulièrement efficace pour inhiber la prolifération des Caco-2. De la même façon, d'autres études ont montré que le butyrate permet l'arrêt de la croissance des colonocytes cancéreux

in vivo et in vitro et de même qu'il inhibe l'hyperprolifération des lésions prénéoplasiques (84,103,164,165). De plus, son effet inhibiteur de croissance cellulaire se retrouve autant chez les cellules de type Caco-2 que pour d'autres lignées cellulaires telles les HT29 et les SW 116, cet effet n'est donc pas spécifique aux Caco-2 seulement (162). En fait, le butyrate agit au niveau du cycle cellulaire en le bloquant à la phase G1-S via l'augmentation de l'expression des protéines p21 et p27, deux inhibiteurs des cyclines dans le cycle cellulaire (90,95,166). De plus, le butyrate permet l'arrêt du cycle à une phase plus avancée soit la phase G2-M, en diminuant l'activité de p34<sup>cdc2</sup>, impliqué dans la progression du cycle (91). Par ailleurs, le butyrate est également impliqué dans la régularisation de la croissance des cellules et leur adhésion (80,84). Ainsi, il a été suggéré que le butyrate module l'expression de plusieurs oncogènes tels le c-myc, le ras, le srs, le c-fos et le c-jun, (82,83,84,85) et ce, à travers une hyperacétylation des histones et une hyperméthylation de l'ADN (167,168). Ces régulations effectuées sur les oncogènes sont directement associées à un degré plus élevé de différenciation et inversement associées à la croissance cellulaire. Toutefois, l'incubation des Caco-2 avec la carnitine seule offre un effet inhibiteur de moindre intensité comparativement au butyrate. Cette observation est tout de même en accord avec d'autres études qui ont considéré la carnitine comme un agent anticancérigène, capable d'inhiber les dommages oxydatifs causés par des substances cancérigènes (11,117,118). Néanmoins, le but premier de l'ajout de la carnitine est de former le composé butyryl-carnitine pour augmenter la demi-vie du butyrate et enfin, améliorer son potentiel anticancérigène. Toutefois, nos résultats provenant de la combinaison de ces deux composés n'ont pas eu les effets additifs escomptés sur l'inhibition de la prolifération. Ces résultats inattendus sont sans doute causés par le faible effet antiprolifératif de la carnitine et ce, en raison d'une période d'incubation trop courte ou d'une concentration trop faible. En effet, des études antérieures faites dans notre laboratoire ont pu montrer un effet antiprolifératif important chez les Caco-2 incubées avec la conjugaison du butyrate et de la carnitine pour une période de 72 heures et à une concentration de 100 mM soit dix fois notre dose utilisée. Néanmoins, dans l'ensemble, nos résultats sur la prolifération sont en accord avec le reste de la littérature suggérant que les effets



bénéfiques des produits laitiers sur la prolifération des cellules cancéreuses sont en partie dus à ces deux composantes.

En second lieu, nos expériences in vitro, nous ont indiqué que le butyrate seul et combiné à la carnitine ont pour effet d'augmenter la mort cellulaire programmée des Caco-2. Ces derniers résultats sont en accord avec ceux confirmant que le butyrate induit l'apoptose dans une grande variété de cellules cancéreuses du côlon (90,95,160,161,167). Dans nos expériences, cette mort cellulaire est bien attribuée majoritairement à de l'apoptose puisque la caractéristique typique apoptotique de dénaturation de l'ADN a été vérifiée sur nos cellules. Bien que le rôle accélérateur du butyrate sur l'apoptose soit clair, la carnitine seule a toutefois un faible effet apoptotique bien que significatif sur les Caco-2, ce qui fait en sorte que la conjugaison du butyrate et de la carnitine n'a pas eu l'intensité apoptotique attendue. Comme pour les résultats sur la prolifération, il semble que la carnitine comparativement au butyrate a besoin de plus de temps d'incubation et à plus forte concentration pour induire l'apoptose. En effet, il a été démontré antérieurement dans notre laboratoire que le butyrate combiné à la carnitine provoque une augmentation significative de l'apoptose avec des concentrations de 50 mM soit cinq fois notre dose, après 72 heures d'incubation. Néanmoins, ces deux composés agissent contre la carcinogenèse du côlon, en augmentant l'expression des anti-oncogènes et en diminuant l'expression un pro-oncogènes, tel qui l'a été rapporté dans plusieurs études précédentes (97,100,140). Par ailleurs, le butyrate agit sur l'induction de plusieurs autres protéines impliquées dans l'amorcement des voies apoptotiques et ces changements précèdent bien entendu l'apoptose. En effet, le butyrate active l'apoptose en induisant la caspase-3 ce qui permet une dégradation de la protéine PARP, afin que s'ensuive la mort cellulaire programmée (98). Aussi, le butyrate induit l'apoptose en augmentant la sensibilité des cellules cancéreuses à la voie apoptotique modulée par le gène Fas (99).

Compte tenu de ces derniers résultats sur l'apoptose, nous avons par la suite examiné d'autres mécanismes moléculaires par lesquels le butyrate en

particulier, mais aussi la carnitine, induisent l'apoptose sur les Caco-2. Pour ce faire, nous avons vérifié la modulation de l'expression des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak, anti-apoptotique Bcl-x, en plus de l'expression de l'enzyme oncogène cyclooxygénase-2 (COX-2) et ce, après 24 heures d'incubation. Dans notre étude, l'apoptose des cellules incubées avec la conjugaison du butyrate et de la carnitine est modulée par une augmentation de l'expression du Bax et du Bak, mais ces deux protéines semblent moins impliquées dans la voie apoptotique des cellules traitées par le butyrate seul et par la carnitine seule. Cependant, d'autres études ont déjà démontré que l'augmentation de l'expression du Bax et du Bak est impliquée dans la voie apoptotique induite par le butyrate (98,168,169). Cette discordance entre nos résultats et les leurs peut être due à certains facteurs dont le type de lignée cellulaire utilisée, la concentration en butyrate et le temps d'incubation avec ce facteur. Pour ce qui des Caco-2 incubées avec la carnitine seule, la faible surexpression induite du Bax et du Bak est certainement associée au faible effet pro-apoptotique provenant de carnitine après 24 heures d'incubation à 10 mM. De plus, il se pourrait que la carnitine n'emprunte pas préférentiellement cette voie apoptotique contrairement à ce qui a été démontré pour le butyrate. Toutefois, cette explication représente seulement une hypothèse, car il n'y a aucune évidence à ce sujet dans la littérature. Concernant maintenant l'expression de la protéine Bcl-x anti-apoptotique, elle se retrouve diminuée chez les cellules traitées avec le butyrate et/ou la carnitine suggérant que ces deux composés sont impliqués dans la voie apoptotique gérée en partie par l'inhibition de la protéine Bcl-x, tout comme d'autres études l'ont déjà mentionné (96,97).

De plus, nous avons montré que la combinaison du butyrate et de la carnitine induit l'apoptose chez les cellules Caco-2 via une inhibition de l'enzyme COX-2. Ainsi, nos résultats sont en lien direct avec ceux des études précédentes indiquant que les composantes des produits laitiers régularisent l'expression de COX-2 (100). Toutefois cette même diminution n'a pas été observée chez les cellules traitées avec le butyrate seulement. Ce dernier résultat devient alors en discordance avec des études antérieures, puisque qu'il a été établi que le butyrate

diminue l'expression de COX-2, cette enzyme régissant la voie apoptotique des cellules cancéreuses (100) et subséquemment la production des prostaglandines. De plus, dans une autre étude, on a constaté que l'expression du COX-2 chez les cellules Caco-2 incubées avec le butyrate est réprimée (170). Cette discordance avec nos résultats peut être expliquée par certains facteurs d'ordre expérimental tels une concentration du butyrate trop faible pour un temps d'incubation (24 heures) trop court, ce qui nous empêche de vérifier ce signal apoptotique. En effet, des données antérieures provenant de notre laboratoire ont indiqué l'existence d'une diminution de l'expression de COX-2 chez les Caco-2 incubées avec 10 mM de butyrate pour 72 heures. La carnitine n'influence pas non plus l'expression du COX-2 après 24 heures d'incubation. Cette dernière donnée, à première vue, s'explique encore une fois par le faible pouvoir apoptotique de 10 mM de carnitine pour 24 heures d'incubation, comme quoi il faudrait certainement attendre plus longtemps afin d'observer ce signal chez les Caco-2 incubées avec la carnitine seulement. En deuxième hypothèse, il se peut également que la carnitine n'agisse pas du tout sur cette enzyme, mais rien dans la littérature ne nous permet de bien comprendre les mécanismes par lesquels la carnitine agit sur le cancer du côlon, ainsi, des études additionnelles sont nécessaires pour se positionner sur le sujet.

Tel que mentionné précédemment, le COX-2 est l'enzyme clé de la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines, elles mêmes impliquées dans la carcinogenèse (134). Des études récentes ont montré que la quantité de PGE<sub>2</sub> synthétisées est augmentée de plus de 50 % dans les biopsies de cancer colorectal (133,135). De plus, les prostaglandines ont un effet significatif sur la prolifération des cellules cancéreuses du côlon (135,171). Partant du fait que les cellules incubées avec la combinaison du butyrate et de la carnitine présentent une diminution de l'expression du COX-2, nous avons noté une réduction de la production des prostaglandines chez ces mêmes cellules. Ces résultats sont alors en lien direct avec les études antérieures montrant que les composantes des produits laitiers présentent leurs effets bénéfiques en modulant la voie des eicosanoïdes et des prostaglandines. De plus, cette observation confirme la précédente puisqu'en inhibant l'expression de COX-2, ces deux composés

diminuent nécessairement la synthèse des prostaglandines. Des études additionnelles sont néanmoins nécessaires pour connaître les autres mécanismes moléculaires par lesquels le butyrate et surtout la carnitine modulent l'apoptose cellulaire. De plus, il serait intéressant de refaire ces mêmes expériences pour une période d'incubation plus longue soit 48 heures et avec des concentrations sensiblement plus élevées, tout en restant physiologiques, comme par exemple 20 mM.

Bien que les résultats des études in vitro soient plutôt unanimes quant aux bienfaits du butyrate, les études in vivo sont davantage contradictoires puisque certaines d'entre elles ont conclu que le butyrate n'a non seulement aucun effet bénéfique, mais augmente le risque de développer un cancer (114). Ces conclusions divergentes sont pour la plupart dues à la courte demi-vie du butyrate, à sa faible biodisponibilité et à la faible quantité de butyrate retrouvé dans le côlon, faisant en sorte que la voie orale d'ingestion du butyrate n'est pas tout à fait appropriée pour les études in vivo. C'est alors pour ces raisons que l'idée de combiner le butyrate et la carnitine a été émise afin d'améliorer la biodisponibilité cellulaire du butyrate et par le fait même, augmenter l'ensemble de ces effets bénéfiques. En effet, il a été démontré que le butyrate peut non seulement prévenir le développement du cancer colorectal, mais il est aussi un agent anti-inflammatoire en inhibant les cytokines pro-inflammatoires, d'où son efficacité dans la maladie de Crohn (103,104) et la colite ulcéreuse (172).

Dans notre étude in vivo, nos résultats ont montré que la consommation de butyrate et de carnitine est associée à une inhibition du développement des lésions cancéreuses et leur progression vers des lésions macroscopiques chez deux modèles de souris, le premier étant environnemental (AOM) et le second génétique (Min). L'utilisation de deux modèles différents nous a permis de mieux vérifier l'impact des diètes sur le développement du cancer du côlon. De plus, ces deux modèles ont été fortement utilisés par d'autres chercheurs et leur fiabilité respective a été démontrée dans plusieurs études in vivo sur le cancer (145,146,152). Pour nos expériences, nous avons divisé les souris dans différents

groupes de diètes afin d'examiner l'effet d'une diète riche en gras supplémentée ou non en carnitine. En fait, des études précédentes, ont démontré que les diètes de type occidental, riche en gras animal, ont pour effet d'augmenter le nombre de lésions cancéreuses intestinales et colorectales chez des souris (173,174). Pour le modèle AOM, l'azoxyméthane a été sélectionné comme l'agent d'induction du cancer du côlon et a été injecté à doses multiples afin que les souris AOM développent rapidement et en plus grand nombre les lésions cancéreuses (175). De plus, le modèle de souris AOM est très représentatif d'un modèle environnemental de cancer du côlon et est très efficace pour étudier l'effet diététique sur la carcinogenèse. Par ailleurs, le second modèle de souris mutantes sur le gène APC fournit un très bon modèle génétique de cancer intestinal pouvant être extrapolé chez l'homme, puisque cette même mutation se retrouve chez les humains atteints de polypose familiale. De plus, les souris Min représentent un bon modèle animal pour étudier le rôle du gène APC et des autres interactions génétiques dans l'initiation des lésions et la progression des tumeurs intestinales (176).

Tout d'abord, nos résultats indiquent que l'addition de la carnitine dans la diète riche en gras laitier est particulièrement efficace pour inhiber les lésions prénéoplasiques i.e. les cryptes aberrantes, pour diminuer le développement de la multiplicité des cryptes et pour inhiber la formation des lésions macroscopiques auprès des souris AOM appartenant à ce groupe diététique. Ainsi, nos données correspondent aux études précédentes ayant démontré que le butyrate, présent dans le gras laitier, est capable d'arrêter la croissance et le développement des cellules cancéreuses in vitro et in vivo (158,159,160,161). En effet, le butyrate inhibe la progression du cancer en interagissant avec des facteurs génétiques malsains menant à l'apparition des tumeurs malignes (177). Cette première observation est aussi en accord avec le fait que le butyrate augmente l'activité des marqueurs de différenciation, laquelle est habituellement réduite chez les cellules cancéreuses (178). D'autres mécanismes ont été suggérés pour expliquer l'effet inhibiteur du butyrate sur la transformation des cellules tumorales. Ainsi, à un niveau moléculaire, le butyrate amène l'hyperacétylation des histones et

l'hyperméthylation de l'ADN (89), ce qui permet d'interférer avec la transcription des gènes, de diminuer l'expression des pro-oncogènes (82,83,84,85,179) et de contribuer à son effet anticancérigène. (80,83,85). De plus, le butyrate est un puissant inhibiteur de l'urokinase dans les cellules cancéreuses, ce qui réduit leur potentiel métastatique (74,75,93).

En plus d'être riche en butyrate, cette dernière diète contient de la carnitine, ce qui a pour conséquence d'améliorer la demi-vie du butyrate (180), d'augmenter sa biodisponibilité et de corriger la déficience en carnitine causée par la forte quantité de butyrate retrouvé dans la diète (105,181). Ainsi, l'effet bénéfique de cette diète provient également de la présence de la carnitine, puisqu'en plus d'améliorer les effets apoptotiques du butyrate et des autres acides gras (182), cet acide aminé possède des propriétés antioxydantes et anticancéreuses (111,117,118). Cependant, nos résultats indiquent également que les souris AOM nourries par la diète riche en gras laitier mais non supplémentée en carnitine, développent significativement plus de cryptes aberrantes et de lésions macroscopiques que les souris AOM nourries avec la diète riche en gras laitier et supplémentée en carnitine. Ces dernières données ne sont donc plus en accord avec le reste de la littérature mentionnant à maintes reprises les effets anticancéreux du butyrate. Cela s'explique certainement par le fait que le butyrate, présent en quantité importante dans cette diète, est associé à une élévation de l'incidence des tumeurs. En effet, des études ont démontré que l'ingestion en excès de butyrate entraîne des effets secondaires néfastes, puisque son métabolisme utilise la carnitine, qui se retrouve à son tour diminuée dans le plasma et les tissus, produisant finalement une hyperammonémie secondaire (105,181). Ces deux conditions étant associées à une augmentation du risque de développer des tumeurs colorectales (111) puisque étant un agent anti-oxydant, une baisse de la carnitine pourrait augmenter les risques de dommages oxydatifs (111,117,118). Ainsi, bien que le butyrate soit un composé ayant des propriétés anticancéreuses (158,159,160,161), il faut néanmoins porter une attention particulière aux concentrations de butyrate dans les études, car le butyrate en quantité plus importante peut alors présenter ces effets néfastes. Toutefois, une

supplémentation en carnitine dans la diète vient corriger les effets secondaires néfastes du butyrate seulement présents dans certaines conditions mentionnées ci haut i.e. l'hyperammonémie et la déficience en carnitine, permettant alors d'offrir tous les effets bénéfiques du butyrate et de la carnitine auprès des souris AOM.

Toutefois, concernant le second modèle de souris (Min), la même diète riche en gras laitier et supplémentée en carnitine n'a pas eu l'effet inhibiteur escompté sur le nombre d'adénomes intestinaux, ce qui nous amène à conclure que la diète n'a pas eu une influence sur ce modèle génétique. Nos résultats deviennent alors en contradiction avec plusieurs autres études ayant démontré que le nombre de lésions cancéreuses chez les souris Min est amplement influencé par des changements diététiques (152,154,156). Dans ce cas-ci, nous pouvons expliquer en partie nos observations par le fait qu'il a été montré dans une étude que les facteurs diététiques associés à un rôle de protection contre le cancer sont moins efficaces pour réduire le risque de cancer chez des sujets qui, au prime abord, sont génétiquement hautement susceptibles de développer le cancer (42). De plus, cette discordance entre nos résultats et ceux de la littérature peut être causée par d'autres conditions telles que le temps d'exposition relativement court (8 semaines) des souris Min à la diète comparativement aux souris AOM (40 semaines) ainsi que le nombre restreint de souris Min par diète (8-9/groupe) comparativement aux souris AOM (14-18/groupe). Ainsi, les prochaines expériences devront compter plus de souris Min par groupe diététique pour une durée d'exposition à la diète plus longue, si possible, vu leur courte espérance de vie. De plus, il serait intéressant d'ajouter un groupe contrôle de souris Min nourries par la diète AIN afin d'avoir un meilleur barème de comparaison. Il faut toutefois mentionner que nos observations auprès des souris Min ne sont pas totalement non-concluantes puisque la diète riche en gras laitier offre tout de même une réduction significative de la longueur des tumeurs intestinales. On observe aussi cette même tendance chez les souris Min nourries par la diète riche en gras laitier et supplémentée en carnitine. Ainsi, bien que les diètes n'aient pas eu les effets escomptés sur l'initiation des adénomes chez les souris Min, il semble néanmoins que les diètes riches en butyrate ont eu des effets inhibiteurs quant à

l'expansion en longueur des tumeurs contrairement à la diète riche en huile de tournesol qui ne présente pas un effet inhibiteur sur cette même expansion (22). Ces résultats confirment le fait que le butyrate est capable *in vitro* et *in vivo* de régulariser la croissance des tumeurs (158,164,183) ainsi que leur diamètre et leur volume (47). Le butyrate agit à ce niveau en bloquant le cycle de la croissance cellulaire des cellules cancéreuses via l'augmentation de l'expression des protéines p21 et p27 (89,90,95), deux inhibiteurs du cycle cellulaire et via la diminution de l'activité de p34<sup>cdc2</sup>, un activateur du cycle (91).

Dans notre étude, les souris provenant des deux modèles, AOM et Min, nourries avec la diète enrichie en gras laitier et en carnitine ont une concentration de carnitine tissulaire plus importante comparativement aux autres groupes de diètes. Ce résultat confirme que la supplémentation en carnitine permet subséquemment d'élever les niveaux tissulaires de celle-ci. En effet, des études ont montré que l'administration de L-carnitine a pour conséquence d'augmenter le niveau de carnitine dans le cerveau du rat (184), dans le foie des souris (185) et dans le plasma des enfants supplémentés (105).

De plus, à la suite de ces dernières observations, nous avons investigué l'activité de l'enzyme carnitine acétyltransférase (CAT), auprès des tissus intestinaux et coliques des souris AOM et Min. Pour les souris AOM nourries par la diète riche en gras laitier mais non enrichie en carnitine, on remarque une déplétion dans l'activité de la CAT tissulaire, mais celle-ci revient à la normale une fois la supplémentation en carnitine rétablie. De plus, nos expériences sur les souris Min ont démontré clairement que l'activité de la CAT a augmenté chez les souris dont la diète est riche en gras laitier et en carnitine, ce qui est en accord avec une étude similaire faite chez le rat (186). De plus, nos observations sont en lien avec les conclusions des autres études confirmant que la supplémentation en carnitine augmente les niveaux circulants de celle-ci et active la CAT dont le but est de former le butyryl-carnitine. Ces deux événements sont, en fait, liés à une incidence moindre de cancer, car la carnitine circulante permet d'inhiber les effets secondaires néfastes des excès en butyrate puis l'activation de la CAT est



impliquée dans le métabolisme oxydatif (11,117,118). De plus, la CAT module la biodisponibilité du butyrate en le combinant à la carnitine et maintient des ratios normaux dans les composantes cellulaires. (187,188). Bien que la CAT présente des effets très favorables au niveau des acides gras à chaîne courte, il serait intéressant d'étudier par ailleurs l'effet du CPT1, une autre enzyme du système de la carnitine, afin d'examiner l'effet de la carnitine sur l'oxydation du butyrate dans les mêmes conditions expérimentales.

En conclusion, notre étude appuie l'hypothèse selon laquelle certaines composantes des produits laitiers possèdent des propriétés anticancéreuses. En effet, *in vitro*, le butyrate et la carnitine sont capables de moduler la croissance et l'apoptose des cellules cancéreuses Caco-2 à travers des mécanismes moléculaires confirmés tels ceux de la famille des Bcl-2 et de la cyclooxygénase-2. La partie *in vivo* de notre étude amène une seconde confirmation des rôles bénéfiques de la carnitine et du butyrate sur le développement de lésions précancéreuses et sur la progression tumorale. De plus, l'augmentation de la biodisponibilité cellulaire du butyrate, une fois combiné à la carnitine afin de former le butyryl-carnitine, a été confirmée *in vivo*.

En plus de notre étude, des études récentes ont également démontré l'efficacité du butyrate dans l'inhibition de la croissance des différents types de cancers résistants à la chimiothérapie comme le cancer gastro-intestinal (189,190,191). Ces résultats combinés à la faible toxicité du butyrate (192) font de ce composé un agent potentiellement très intéressant pour la chimiothérapie. En effet, le butyrate combiné à la carnitine semble être un agent thérapeutique qui mérite d'être utilisé en clinique en plus des traitements standards, pour soigner les patients atteints du cancer colorectal.

## RÉFÉRENCES

1. Potter JD. Colorectal cancer: molecules and population. *J Natl Cancer Inst* 91: 916-932, 1991.
2. McCormick D, Kibbe PJ, Morgan SW. Colon cancer: prevention, diagnosis, treatment. *Gastroenterol Nursing* 25(5): 204-211, 2002.
3. Devesa SS, Blot WJ, Stone BT, Miller BA, Tarone RE, Fraumeni JF. Recent cancer trends in the United States. *J Natl Cancer Inst* 87(3): 175-182, 1995.
4. American Cancer society. Cancer facts and figures. Atlanta, Georgia, *Am Cancer Soc*, publication no.5008.00, 2000.
5. Institut National du Cancer du Canada. *Statistiques canadiennes sur le cancer*. Toronto 1999.
6. Thomas HJ. Familial colorectal cancer. *Brit med J*, 307: 277-278, 1993.
7. Singh PN, Fraser GE. Dietary risk factors for colon cancer in a low-risk population. *Am J Epidemiol* 148(8): 761-773, 1998.
8. Peto J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 411: 390-395, 2001.
9. Giovannucci ED, Rimm ER, Stamper MJ, Colditz GA, Ascherio A, Willet WC. Intake of fat, meat, fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer Res* 54: 2390-2397, 1994.
10. Hsing AW, McLaughlin JK, Chow WH, Schuman LM, Chien HT, Gridley G, Bjelke E, Wacholder S, Blot WJ. Risk factors for colorectal cancer in a prospective study among U.S. white men. *Int J Cancer* 77: 549-533, 1998.

11. Lipkin M, Reddy B, Newmark H, Lamprecht SA. Dietary factors in human colorectal cancer. *Ann Rev Nutr* 19: 545-586, 1999.
12. Slattery ML, Boucher KM, Caan BJ, Potter JD, Ma KN. Eating patterns and risk of colon cancer. *Am J Epidemiol* 148(1): 1-16, 1998.
13. Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE. Relation of meat, fat and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med* 323: 1664-1672, 1990.
14. Hursting SD, Thornquist M, Henderson MM. Types of dietary fat and incidence of cancer at five sites. *Prev Med* 19: 242-253, 1990.
15. Bostick RM. Diet and nutrition in the etiology and primary prevention of colon cancer. In: Bendich A, Deckelbaum RJ, eds. *Preventive nutrition: the comprehensive guide for health professionals*. Totowa, Humana Press, 57-95, 1997.
16. Chiu BC, Ji BT, Gridley G, McLaughlin JK, Gao YT, Fraumeni JF, Chow WH. Dietary factors and risk of colon cancer in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol Biom Prev* 12(13): 201-208, 2003.
17. Potter JD, Slattery ML, Bostick RM, Gapstur SM. Colon cancer: a review of the epidemiology. *Epidemiol Rev* 15: 499-545, 1993.
18. Ghadirian P, Lacroix A, Maisonneuve P, Perret C, Potvin C, Gravel D, Bernard D, Boyle P. Nutritional factors and colon carcinoma: a case-control study involving French Canadian in Montreal, Qc, Canada. *Cancer* 28: 858-864, 1997.

19. Le Marchand L, Wilkens LR, Hankin JH, Kolonel LN, Lyu LC. A case-control study of diet and colorectal cancer in a multiethnic population in Hawaii (United States): lipids and foods of animal origin. *Cancer Cause Control* 8: 637-648, 1997.
20. De Deckere EA. Possible beneficial effects of fish and fish n-3 polyunsaturated fatty acids in breast and colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev* 8(3): 213-221, 1999.
21. Sinha K, Chow WH, Kulldorff M, Denobile J, Bulter J, Closas M, Weil K, Hoover RN, Rothman N. Well-done, grilled red meat increases the risk of colorectal adenomas. *Cancer Res* 59: 4320-4324, 1999.
22. Nkondjock A, Shatenstein B, Maisonneuve P, Ghadirian P. Assessment of risk associated with specific fatty acids and colorectal cancer among French-Canadians in Montreal: a case-control study. *Int J Epidemiol* 32(2): 200-209, 2003.
23. Tannenbaum A, Silverstone A. Nutrition in relation to cancer. *Adv Cancer Res* 1: 451-501, 1953.
24. Mason JB. Nutritional chemoprevention of colon cancer. *Semin Gastrointest Dis* 13(3): 143-153, 2002.
25. Reddy BS, Wang CX, Maruyama H. Effect of restricted caloric intake on azoxymethane-induced colon tumor incidence in male F344 rats. *Cancer Res* 47: 1226-1228, 1987.
26. Kumar SP, Roy SJ, Tokumo K, Reddy BS. Effect of different levels of caloric restriction on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *Cancer Res* 50: 5761-5766, 1990.

27. Morgan JW, Singh PN. Diet, body mass index and colonic epithelial proliferation in a healthy population. *Nutr Cancer* 23: 247-257, 1995.
28. Giovannuci E. Modifiable risks factors of colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 31(4): 925-943, 2002.
29. Potter JD, Nutrition and colorectal cancer. *Cancer Cause Control* 7: 127-146, 1996.
30. Longnecker MP, Orza MJ, Adams ME, Vioque J, Chalmers TC. A meta-analysis of alcoholic beverage consumption in relation to risk of colorectal cancer. *Cancer Cause Control* 1: 59-68, 1990.
31. De Stefani E, Mendilaharsu M, Deneo-Pellegrini H. Sucrose as a risk factor for cancer of the colon and rectum: A case-control study in Uruguay. *Int J Cancer* 75: 40-44, 1998.
32. Ames BN, Gold LS, Willett WC. The causes and prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5258-5265, 1995.
33. Hartman TJ, Tangrea JA, Pietinen P, Malila N, Virtanen M, Taylor PR, Albanes D. Tea and coffee consumption and risk of colon cancer and rectal cancer in middle-aged Finnish men. *Nutr Cancer* 31(1): 41-48, 1998.
34. Kohlmeier L, Weterling KGC, Steck S, Kok FJ. Tea and cancer prevention: an evaluation of the epidemiologic literature. *Nutr Cancer* 27(1): 1-13, 1997.
35. Su LJ, Arab L. Tea consumption and the reduced risk of colon cancer-result from a national prospective cohort study. *Public Health Nutr* 5(3): 419-425, 2002.

36. Friedenreich CM, Brant RF, Riboli E. Influence of methodologic factors in a pooled analysis of 13-case-control studies of colorectal cancer and dietary fiber. *Epidemiology* 5: 66-79, 1994.
37. Steinmetz KA, Potter JD. Vegetable, fruits and cancer II: Mechanisms. *Cancer Cause Control* 2: 427-442, 1991.
38. Gaard M, Tretlis S, Loken EB. Dietary risk factors and risk of colon cancer: a prospective study of 50 535 young Norwegian men and women. *Eur J Cancer Prev* 5: 445-454, 1996.
39. Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruits and cancer I: Epidemiology. *Cancer Cause Control* 2: 325-357, 1991.
40. Kim DJ, Shin DH, Anh B, Kang JS, Nam KT, Park CB, Kim CK, Hong JT, Kim YB, Yun YW, Jang DD, Yang KH. Chemoprevention of colon cancer by Korean food plant components. *Mutat Res* 523-524: 99-107, 2003.
41. Patterson RE, White E, Kristal AR, Neuhaus ML, Potter JD. Vitamin supplements and cancer risk: the epidemiology evidence. *Cancer Cause Control* 8: 786-802, 1997
42. Sellers TA, Bazyk AE, Bostick RM, Kushi LH, Olson JE, Anderson KE, Lazovich D, Folsom AR. Diet and risk of colon cancer in a large prospective study of older women: an analysis stratified on family history (IOWA, USA). *Cancer Cause Control* 9: 357-367, 1998.
43. Davis CD, Zeng H, Finley JW. Selenium-enriched broccoli decreases intestinal tumorigenesis in multiple intestinal neoplasia mice. *Nutr* 132(2): 307-309, 2002.
44. Willett WC. Diet and cancer. *The Oncologist* 5: 393-404, 2000.

45. Mason JB, Choi SW. The mechanisms by which folate depletion enhances colorectal carcinogenesis: A unified scheme. *Cancer and Nutrition: Prevention and Treatment*. In: Mason JB, Nitenberg G, eds, vol.4, 87-101, 2000.
46. Kim YI. Folate and carcinogenesis: Evidence, mechanisms and implications. *J Nutr Biochem* 10: 66-88, 1999.
47. Parodi PW. Cow's milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *J Nutr* 127: 1055-1060, 1997.
48. Garland CF, Garland FC, Gorham ED. Calcium and vitamin D: Their potential roles in colon and breast cancer prevention. *Ann NY Acad Sc* 889: 107-119, 1999.
49. Baron JA, Beach M, Mandel JS, Van Stolk RU, Haile RW, Sandler RS, Rothstein R, Summers RW, Snover DC, Beck GJ, Bond JH, Greenberg ER. Calcium supplements for prevention of colorectal adenomas. *N Engl J Med* 340: 101-107, 1999.
50. Pence BC. Role of calcium in colon cancer prevention: experimental and clinical studies. *Mutat Res* 290: 87-95, 1993.
51. Lipkin M. Early development of cancer chemopreventive clinical trials: studies of dietary calcium as chemopreventive agent for human subjects. *Eur J Cancer Prev* 11(suppl.2): S65-S70, 2002.
52. Martinez ME, Giovannucci EL, Colditz GA, Stampfer MJ, Hunter DJ, Speizer FE, Wing A, Willett WC. Calcium, vitamin D and occurrence of colorectal cancer among woman. *J Natl Cancer Inst* 88: 1375-1382, 1996.

53. Kearney J, Giovannucci EL, Rimm EB, Aschirio A, Stamper MJ, Colditz GA, Wing A, Kampman E, Willett WC. Calcium, vitamin D, dairy foods and the occurrence of colon cancer in men. *Am J Epidemiology* 143: 907-917, 1996.
54. Ha YL, Stockson J, Parisa MW. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse for estomach neoplasia by conjugated linoleic dienoic derivates of linoleic acid. *Cancer Res* 50: 1097-1101, 1990.
55. Liew C, Schut AAJ, Chin SF, Parisa MW, Dorshwood RH. Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidaza quinoline-induced colon carcinogenesis in the F344 rat: a study of inhibitory mechanisms. *Carcinogenesis* 15: 3037-3043, 1995.
56. Ip C, Singh M, Thompson HJ, Scimeca JA. Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferation activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Res* 54: 1212-1215, 1994.
57. Schultz TD, Chew BP, Seaman WK, Luedeeke LO. Inhibitory effect of conjugated dienoic derivates of linoleic acid and  $\beta$ -carotene on the in vitro growth of human cancer cells. *Cancer Lett* 63: 125-133, 1992.
58. Kavanaugh CJ, Liu KL, Belury MA. Effect of dietary conjugated linoleic acid on phorbol ester-induced PGE<sub>2</sub> production and hyperplasia in mouse epidermis. *Nutr Cancer* 33: 132-138, 1999.
59. Hannum YA, Linardic CM. Sphinogolipid break down products antiproliferative and tumor suppressor lipids. *Biochem Biophys Acta* 1154: 223-236, 1993.
60. Mervill A, Hannum YA, Bell RM. Introduction: Sphingolipids and their metabolites in cell regulation. *Adv Lipid Res* 25: 1-24, 1993.



61. Dillehay DL, Webb SK, Schmelz EM, Merrill AH. Dietary sphingomyelin inhibits 1,2-dimethylhydrazine induced colon cancer in CF1 mice. *J Nutr* 124: 615-620, 1994.
62. Schmelz, Dilleray DL, Webb SK, Reiter A, Adams JU, Merrill AM Jr. Sphingomyelin consumption suppresses aberrant colonic crypt foci and increases the proportion of adenomas versus adenocarcinomas in CF1 mice treated with 1,2 dimethylhydrazine: implications for dietary sphingolipids and colon carcinogenesis. *Cancer Res* 56(21): 4936-4941, 1996.
63. Marteau PR, De Vrese M, Cellier CJ, Schrezenmeir J. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr* 73(suppl.): 430S-436S, 2001.
64. Brady LJ, Gallaher DD, Busta FF. The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. *J Nutr* 130: 410S-414S, 2000.
65. Wollowski I, Rechkemmer G, Poll-Zobel B. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr* 73(suppl.): 451S-455S, 2002.
66. Goldin BR, Gualtieri LJ, Moore RP. The effect of lactobacillus GG on the initiation and promotion of DNH-induced intestinal tumors in the rat. *Nutr Cancer* 25: 197-204, 1996.
67. Rafter JJ. The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention. *Scand J Gastroenterol* 30: 497-502, 1995.
68. Kampman E, Goldbohm RA, Vanden Brandt PA, Van't Veer P. Fermented dairy products calcium and colorectal cancer in the Netherlands cohort study. *Cancer Res* 54: 3186-3190, 1994.

69. Rafter J. Lactic acid bacteria and cancer: mechanisms perspective. *Br J Nutr* 88(suppl.): S89-S94, 2002.
70. Ruemmele F, Ruemmele C, Levy E, Seidman E. Les mécanismes moléculaires de la régulation du renouvellement des cellules épithéliales intestinales par des nutriments. *Gastroenterol Clin Biol* 23 : 147-155, 1999.
71. Velasquez OC, Seto RW, Rombeau JL. The scientific rationale and clinical application of short-chain fatty acids and medium-chain triacylglycerols. *Proc Nutr Soc* 55: 49-78, 1996.
72. Binder HJ, Mehta P. Short-chain fatty acids stimulate active sodium and chloride absorption in vitro in the rat distal colon. *Gastroenterology* 96: 898-996, 1989.
73. Gäbel G, Volger S, Martens H. Short-chain fatty acids and CO<sub>2</sub> regulators of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> absorption in sheep rumen mucosa. *J Comp Physiol* 161: 419-426, 1991.
74. Wächtershäuser A, Stein J. Rationale for the luminal provision of butyrate in intestinal diseases. *Eur J Nutr* 39 : 164-171, 2000.
75. Gibson PR, Moeller I, Kagelari O, Folino M, Young GP. Contrasting effects of butyrate on differentiation of neoplastic and nonneoplastic colonic epithelial cells. *J Gastroenterol Hepatol* 7: 165-172, 1992.
76. Janne P, Carpenter Y, Williams G. Colonic mucosal atrophy induced by a liquid elemental diet in rats. *Am J Dig Dis* 22: 808-812, 1977.
77. Ichikawa H, Sakata T. Stimulation of epithelial cell proliferation of isolated distal colon of rats by continuous colonic infusion of ammonia on short-chain fatty acids is non additive. *J Nutr* 128: 843-847, 1998.

78. Smith JG, Yokoyama WH, German JB. Butyric acid from the diet: actions at the levels of gene expression. *Food Sc* 38(4): 259-297, 1998.
79. Schafer WR, Kim R, Sterne R, Thorner J, Kim SH, Rine J. Genetic and pharmacological suppression of oncogenic mutations in ras gene of yeast and humans. *Science* 245: 379-385, 1989.
80. Reeves R, Dserjesi P. Sodium butyrate induces new gene expression in Friend erythroleukemic cells. *J Biol Chem* 254: 4383-4390, 1979.
81. Vidali G, Boffa LC, Bradbury EM, Alfred VG. Butyrate suppression of histone deacetylation leads to accumulation of multiacetylated forms of histone H3 and H4 and increased DNase I sensitivity of the associated DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci* 75: 2239, 1978.
82. Taylor CW, Kim YS, Childress-Fields RE, Yeoman LC. Sensitivity of nuclear c-myc levels and induction to differentiation-inducing agents in human colon tumor cell lines. *Cancer Lett* 62: 95-105, 1992.
83. Basson MD, Emenaker NJ, Hong F. Differential modulation of human (Caco-2) colon cancer cell line phenotype by short chain fatty acids. *Proc Soc Exp Biol Med* 217: 476-483, 1998.
84. Velazquez OC, Lederer HM, Rombeau JL. Butyrate and colonocytes. *Dig Dis Sc*, 41(4): 727-739, 1996.
85. Marcu KB, Bossone SA, Patel AJ. Myc function and regulation. *Ann Rev Biochem* 61: 809-860, 1992.
86. Boffa L, Vidali G, Mann R, Alfred V. Manifold effects of sodium butyrate on nuclear factors. Selective and reversible inhibition of phosphorylation of

histones H1 and H2A and impaired methylation of lysine and arginine residues in nuclear protein fractions. *J Biol Chem* 256: 9612-9621, 1981.

87. Rastl E, Swelty P. Expression of poly-(adenosine diphosphate-ribose) polymerase activity in erythroleukemic mouse cells during cell cycle and erythropoietic differentiation. *J Biol Chem* 253: 4333-4340, 1978.
88. Whitlock JP, Galeazzi D, Schlumann H. Acetylation and calcium dependant phosphorylation of histone H3 in nuclei from butyrate-treated HeLa cells. *J Biol Chem* 258: 1299-1304, 1983.
89. Hinnebush BF, Meng S, Wu JT, Archer SY, Hodin RA. The effect of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J Nutr* 132(5): 1012-1017, 2002.
90. Litvak DA, Hwang KO, Evers BM, Townsend CM. Induction of apoptosis in human gastric cancer by sodium butyrate. *Anticancer Res* 20: 779-784, 2000
91. Harrison LE, Wang QM, Studzinski GP. Butyrate-induced G2/M block in Caco-2 colon cancer cells is associated with decreased p34<sup>cdc2</sup> activity. *Soc Exp Biol Med* 222: 150-156, 2000.
92. Mortensen PB, Clausen MR. Short-chain fatty acids in the human colon: relation to gastrointestinal health and disease. *Scand Gastroenterol* 216(suppl.31): 132-148, 1996.
93. Bell L, Willams L. Histochemical demonstration of alkaline phosphatase in human large intestine, normal and diseases. *Histochemistry* 60: 84-90, 1979.
94. Young GP, Macrae FA, Gibson PR, Alexeyeff M, Whitehead R. Brush border hydrolases in normal and neoplastic colonic epithelium. *J Gastroenterol Hepatol* 7: 347-357, 1992.

95. Litvak DA, Evers ME, Hwang KO, Hellmich MR, Ko TC, Townsend CM. Butyrate-induced differentiation of Caco-2 is associated with apoptosis and early induction of p21<sup>Waf1/Cip1</sup> and p27<sup>Kip1</sup>. *Surgery* 124: 161-170, 1998.
96. Mendel T, Schaubert J, Kreth F, Kudlich T, Melcher R, Gostner A, Scheppach W, Luhrs H. Butyrate and aspirin in combination have an enhanced effect on apoptosis in human colorectal cancer cells. *Eur J Cancer Prev* 11(3): 271-81, 2002.
97. Ruemmele FM, Schwartz S, Seidman EG, Dionne S, Levy E, Lentze MJ. Butyrate induced Caco-2 cell apoptosis is mediated via the mitochondrial pathway. *Gut* 52(1): 94-100, 2003.
98. Ruemmele FM, Dionne S, Qureshi I, Sarma DR, Levy E, Seidman EG. Butyrate mediates Caco-2 cell apoptosis via up-regulation of pro-apoptotic Bak and inducing caspases-3 mediated cleavage of poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP). *Cell Death Differ* 6: 729-735, 1999.
99. Bonnotte B, Favre N, Reveneau S, Micheau O, Droin N, Garridoc C, Fontana A, Chouffert B, Solary E, Martin F. Cancer cell sensitization to Fas-mediated apoptosis by sodium butyrate. *Cell Death Differ* 5: 480-487, 1998.
100. Crew TE, Elder DJE, Paraskeva C. A cyclooxygenase-2 (COX-2) selective non-steroidal anti-inflammatory drug enhances the growth inhibitory effect of butyrate in colorectal carcinoma cells expressing COX-2 protein: regulation of COX-2 by butyrate. *Carcinogenesis* 21(1): 69-77, 2000.
101. Toribara NW, Sack TL, Gum JK, Hos B, Shively JE, Willson JKV, Kim YS. Heterogeneity in the induction and expression of carcinoembryonic antigen-related antigens in human colon cancer cell lines. *Cancer Res* 49: 3321-3327, 1989.

102. Heerdt BG, Augenlicht LH. Effects of fatty acid on expression of genes encoding subunits of cytochrome-c oxidase and cytochrome-c oxidase activity in HT29 human colonic adenocarcinomas cells. *J Biol Chem* 266: 19120-19126, 1991.
103. Andoh A, Tsujikawa T, Fujiyama Y. Role of dietary fiber and short fatty acids in the colon. *Curr Pharm Des* 9(4): 347-358, 2003.
104. Segain JP, Raingeard de la Blétière D, Boureille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, Bonnet C, Blotti  re HM, Galmiche JP. Butyrate inhibits inflammatory responses through NF  B inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 47: 397-403, 2000.
105. Rebouche CJ. Carnitine function and requirement during the life cycle. *FASEB J* 6: 3379-3386, 1992.
106. Penn D, Dolderer M, Schmidt-Sommerfeld E. Carnitine concentrations in the milk of different species and infant formulas. *Biol Neonate* 52: 70-79, 1987.
107. Sandor A, Pecsuvac K, Kerner J, Alkonyi I. On carnitine content on the human breast milk. *Pediatr Res* 16: 89-91, 1982.
108. Lombard KA, Olson AL, Nelson SE, Rebouche CJ. Carnitine status of lactoovovegetarians and strict vegetarian adults and children. *Am J Clin Nutr* 50: 301-306, 1989.
109. Rebouche CJ, Seim H. Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals. *Annu Rev Nutr* 18: 39-61, 1998.

110. Elimrani I, Lahjouhi K, Seidman EG, Roy MJ, Mitchell GA, Qureshi I. Expression and localization of organic cation/carnitine transporter OCTN2 in caco-2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284: G863-G871, 2003.
111. Peluso G, Nicolai R, Reda E, Benatti P, Barbarisi A, Calvani M. Cancer and anticancer therapy-induced modifications on metabolism mediated by carnitine system. *J Cell Physiol* 182: 339-350, 2000.
112. Vaz FM, Wanders RJA. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem J* 361: 417-429, 2002.
113. Deshner EE, Ruperto JF, Lupton RJ, Newmark HL. Dietary butyrate (tributylin) does not enhance AOM-induced colon tumorigenesis. *Cancer Lett* 52: 79-82, 1990.
114. Freeman HJ. Effects of differing concentrations of sodium butyrate on 1,2 dimethyldrazine induced rat intestine neoplasia. *Gastroenterology* 91: 596-602, 1986.
115. Lupton O, Rosenrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Butyrate and colonic cytokinetics: differences between in vitro and in vivo studies. *Eur J Cancer Prev* 4: 373-378, 1995.
116. Famularo G, De Simone C. A new era for carnitine ? *Immunology Today* 16(5): 211-212, 1995.
117. Boerrigte ME, Franceschi C, Arrigoni-Martelli E, Wei JY, Vijg J. The effect of L-carnitine and acyl-L-carnitine on the disappearance of DNA single strand breaks in human peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis* 14: 2131-2136, 1993.

118. Ames BN. Micronutriments prevent cancer and delay aging. *Toxicology Lett* 102-103: 5-8, 1998.
119. Spitz MR, Bondy ML. Genetic susceptibility to cancer. *Cancer* 72: 992-995, 1993.
120. Fearon ER, Jones PA. Progressing toward a molecular description of colorectal cancer development. *FASEB J* 6: 2783-2790, 1992.
121. Bird RJ. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett* 93: 55-71, 1995.
122. Mclellan EA, Medline A, Bird RP. Sequential analyses of the growth and morphological characteristics of aberrant crypt foci: putative preneoplastic lesions. *Cancer Res* 51: 5270-5274, 1991.
123. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts R, Watson JD. Biologie moléculaire de la cellule. Éditions Flammarion, Deuxième édition, France, chapitre 13, p.727-790, 1990.
124. Wyllie AH. Apoptosis and carcinogenesis. *Eur J Cell Biol* 73: 189-197, 1997.
125. Van Den Berg FM, Tigges AJ, Schipper MEI, Den Hartog-Jager FCA, Kroes WGM, Walboomers JMM. Expression of the nuclear oncogene p53 in colon tumors. *J Pathol* 157: 193-199, 1989.
126. Kemp CJ, Sun S, Gurley KE. P53 induction and apoptosis in response to radio- and chemotherapy in vivo is tumor type-dependent. *Cancer Res* 61: 327-332, 2001.
127. Sheikh MS, Fornace AJ. Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol* 182: 171-181, 2000.



128. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. P53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 74: 957-967, 1993
129. Stopera SA, Bird RP. Immunohistochemical demonstration of mutant p53 tumour suppressor gene product in aberrant crypt foci. *Cytobios* 73: 73-88, 1993.
130. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preiseinger AC, Jessup JM, Van Tuinen P, Ledbett DH, Barker DF, Bakamura Y, White R, Vogelstein B. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244: 217-221, 1989.
131. Slattery ML, Curtin K, Ma K, Edwards S, Schaffer D, Anderson K, Samowitz W. Diet, activity and lifestyle associations with p53 mutations in colon tumors. *Cancer Epidemiol Bio Prev* 11(6): 541-548, 2002.
132. Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmoll HJ. Cyclooxygenase-2: novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol* 127: 411-417, 2001.
133. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, Dubois R. Up-regulation of cyclooxygenase-2 gene expression in human colorectal adenomas and adenomacarcinomas. *Gastroenterology* 107: 1183-1188, 1994.
134. Tsujii M, Kawano S, Dubois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastasis potential *Proc Natl Acad Sci* 94: 3336-3340, 1997.
135. Pugh S, Thomas GAO. Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandins E<sub>2</sub>. *Gut* 35: 675-678, 1994.

136. Tsujii M, Kawano S, Tsujii S, Sawaoka H, Hori M, Dubois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 93: 705-716, 1998.
137. Chen WS, Wei SJ, Liu JM, Hsiao M, Kou-Lin J, Yang WK. Tumor invasiveness and liver metastasis of colon cancer cells correlated with cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and inhibited by COX-2-selective inhibitor, etodolac. *Int J Cancer* 91: 894-899, 2001.
138. Thun MJ, Henley J, Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic and clinical issues. *J Natl Cancer Inst* 94: 252-266, 2002.
139. Singh J, Hamid R, Reddy BS. Dietary fat and colon cancer: modulation of cyclooxygenase-2 by types and amount of dietary fat during the postinitiation stage of colon carcinogenesis. *Cancer Res* 57: 3465-3470, 1997.
140. Koshiji M, Adachi Y, Sogo S, Taketani S, Oyaizu N, Than S, Inaba M, Phawa S, Hioki K, Ikehara S. Apoptosis of colorectal adenocarcinoma (COLO 201) by tumour necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) and/or interferon-gamma (INF- $\gamma$ ) resulting from down-modulation of Bcl-2 expression. *Clin Exp Immunol* 111: 211-218, 1998.
141. Moss SF, Agarwal B, Arber N, Guan RJ, Krajewska M, Krajewska S, Reed JC, Holt PR. Increased intestinal Bak expression results in apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 223: 199-203, 1996.
142. Langman M, Boyle P. Chemoprevention of colorectal cancer. *Gut* 43: 578-585, 1998.
143. Levy E, Mehran M, Seidman EG. Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *FASEB J* 9: 626-635, 1995.

144. Delie F, Rubas W. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 14(3): 221-286, 1997.
145. Takahashi T, Satou M, Watanabe N, Sakaitani Y, Takagi A, Uchida K, Ikeda M, Moriyama R, Matsumoto K, Morotomi M. Inhibitory effect microfibril wheat bran on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in CF1 mice. *Cancer Lett* 141: 139-146, 1999.
146. Yang K, Lamprecht SA, Liu Y, Shinozaki H, Fan K, Leung D, Newmark H, Steele VE, Kelloff GJ, Lipkin M. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. *Carcinogenesis* 21(9): 1655-1660, 2000.
147. Maltzman T, Whittington J, Driggers L, Stephens J, Ahnen D. AOM-induced mouse colon tumors do not express full-length APC protein. *Carcinogenesis* 18(12): 2435-2439, 1997.
148. Yamada Y, Hata K, Hirose Y, Hara A, Sugie S, Kuno T, Yoshimi N, Tanaka T, Mori H. Microadenomatous lesions involving loss of APC heterozygosity in the colon of adult APC<sup>Min/+</sup> mice. *Cancer Res* 62: 6367-6370, 2002.
149. Srivastava S, Verma M, Henson D. Biomarkers for early detection of colon cancer. *Clin Cancer Res* 7(5): 1118-1126, 2001.
150. Field W, Caspari R, Sengteller M, Uhlhaas S, Lamberti C, Jungck M, Kadmon M, Wolf M, Fahnenstich J, Gebert J, Möslein G, Mangold E, Propping P. Can APC mutation analysis contribute to therapeutic decisions in familial adenomatous polyposis ? Experience from 680 FAP families. *Gut* 48: 515-521, 2001.

151. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87: 159-170, 1996.
152. Ushida Y, Sekine K, Kuhara T, Takasuka N, Ligo M, Tsuda H. Inhibitory effects of lactoferrin on intestinal polyposis in the APC<sup>Min</sup> Mouse. *Cancer Lett* 134: 141-145, 1998.
153. Tucker JM, Davis C, Kitchens ME, Bunni MA, Priest DG, Spencer HT, Berger FG. Response to 5-fluorouacil chemotherapy is modified by dietary folic acid deficiency in APC<sup>Min/+</sup> mice. *Cancer Lett* 187: 153-162, 2002.
154. Kennedy AR, Beazer-Barclay Y, Kinzler K, Newberne PM. Suppression of carcinogenesis in the intestines in Min mice by soybean-derived Bowman-Birk inhibitor. *Cancer Res* 56: 679-682, 1996.
155. Orner GA, Dashwood WM, Blum CA, Diaz GD, Li Q, Dashwood RH. Suppression of tumorigenesis in the APC min mouse: down-regulation of  $\beta$ -catenin signaling by a combination of tea plus sulindac. *Carcinogenesis* 24(2): 263-267, 2003.
156. Paulsen JE. Modulation by dietary factors in murine FAP models. *Toxicology Lett* 112-113: 403-409, 2000.
157. Van Der Meer R, Lapré JA, Govers MJAP, Kleibeurer JH. Mechanisms of the intestinal effects of dietary fats and milk products on colon carcinogenesis. *Cancer Lett* 114: 75-83, 1997.
158. Archer S, Meng S, Jonhson WJ, Tang R, Hodin R. Butyrate inhibits colon carcinoma cell growth through distinct pathways. *Surgery* 124: 248-253, 1998.

159. Basson MD, Turowski GA, Rashid Z, Hong F, Madri JA. Regulation of human colonic cell line proliferation and phenotype by sodium butyrate. *Dig Dis Sci* 41: 1986-1993, 1996.
160. Hague A, Manning AM, Hanlon KA, Huschtscha L, Hart D, Paraskeva C. Sodium butyrate induces apoptosis in a human colonic tumor cell lines in a p-53 independent pathway-implications for the possible role of dietary fibers in the prevention of large bowel cancer. *Int J Cancer* 55; 489-505, 1993.
161. Heerdt BG, Houston MA, Augenlicht LH. Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer Res* 54: 3288-3293, 1994.
162. Siavoshian S, Blotti re HM, Le Foll E, Kaeffer B, Cherbut C, Galmiche JP. Comparison of the effect of different short chain fatty acid on the growth and differentiation of human colonic cell lines. *Cell Biol Int* 21: 281-287, 1997.
163. Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, McFarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28: 12221-12227, 1987.
164. Barnard JA, Warwick G. Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT29 cells. *Cell Growth Differ* 4: 495-501, 1993.
165. Medina V, Afonso JJ, Alvarez-Arguelles H, Hernandez C, Gonzalez F. Sodium butyrate inhibits carcinoma development in a 1,2 dimethylhydrazine-induced rat colon cancer. *JPEN* 22: 14-17, 1998.
166. Siavoshian S, Segain JP, Kornprobst M, Bonnet C, Cherbut C, Galmiche JP, Blotti re HM. Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelium cells; induction of cyclin D3 and p21 expression. *Gut* 46: 507-514, 2000.

167. Boffa LC, Vidali G, Mann RS, Allfrey VG. Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate. *J Biol Chem* 254: 4383-4390, 1979.
168. De Hann JB, Gevers W, Parker MI. Effects of sodium butyrate on the synthesis and methylation of DNA in normal cells and their transformed counterparts. *Cancer Res* 46(2): 713-716, 1986.
167. Hague A, Paraskeva C. The short-chain fatty acid butyrate induces apoptosis in colorectal tumor cell lines. *Eur J Cancer Prev* 4: 359-364, 1995.
168. Liu LU, Holt PR, Krivosheyev V, Moss SF. Human right and left colon differ in epithelial cell apoptosis and in expression of Bak, a pro-apoptotic Bcl-2 homologue. *Gut* 45: 45-50, 1999.
169. Mandal M, Olson DJ, Sharma T, Vadlamudi RK, Kumar R. Butyric acid induces apoptosis by up-regulating Bax expression via stimulation of the c-jun N-terminal kinase/activation protein-1 pathway in human colon cancer cells. *Gastroenterology* 120: 71-78, 2001.
170. Kamitani H, Geller M, Eling T. Expression of 15-lipoxygenase by human colorectal carcinoma Caco-2 cells during apoptosis and cell differentiation. *J Biol Chem* 273: 21569-21577, 1998.
171. Qiao L, Kozoni V, Tsioulinas GJ, Koutos MI, Hanif R, Shiff SJ, Rigas B. Selected eicosanoids increase the proliferation rate of human colon carcinoma cell lines and mouse colonocytes in vivo. *Bioch Bioph Acta* 1258: 215-223, 1995.

172. Scheppach WM, Sommer H, Kirchner T, Paganelli GM, Bartram P, Christl S, Richter F, Dusel G, Kasper H. Effect of butyrate enemas on the colonic mucosa in distal ulcerative colitis. *Gastroenterology* 103: 51-56, 1992.
173. Hioki K, Shivapurkar N, Oshima H, Alabaster O, Oshima M, Taketo MM. Suppression of intestinal polyp development by low-fat and high fiber diet in APC<sup>Δ716</sup> knockout mice. *Carcinogenesis* 18: 1863-1865, 1997.
174. Lipkin M. New rodent models for studies of chemopreventive agents. *J Cell Biochem* 28-29(suppl.): 144-147, 1997.
175. Magnuson BA, Shirliff N, Bird RP. Resistance of aberrant crypt foci to apoptosis induced by azoxymethane in rats chronically fed cholic acid. *Carcinogenesis* 15: 1459-1462, 1994.
176. Moser AR, Luongo C, Gould KA, Mcneley MK, Shoemaker AK, Dove WF. APC<sup>min</sup> : A mouse model for intestinal and mammary tumorigenesis. *Eur J Cancer* 31: 1061-1064, 1995.
177. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767, 1990.
178. Young GP, Macrac FA, Gibson PR. Brush border hydrolases in normal and neoplastic colonic epithelium. *J Gastroenterol Hepatol* 7: 347-354, 1990.
179. Chapkin RS, Fan YY, Lupton JR. Effect of diet on colonic-programmed cell death: molecular mechanism of action. *Toxicology Lett* 112-113: 411-414, 2000.
180. Marx G, Lannes M, Dionne S, Levy E, Qureshi I, Lévesque D, Seidman EG. Effects of butyrate, conjugated linoleic acid and carnitine on Caco-2 cell

proliferation and apoptosis. Presented DDW 101<sup>st</sup> Annual Meeting on the AGA. San Diego, CA, May 2000. *Gastroenterology* 188: A-550, 2000.

181. Chalmers RA, Roc CR, Stacey TE, Hoppel CL. Urinary excretion of L-carnitine and acylcarnitine by patients with disorders of organic metabolism: Evidence for secondary insufficiency of L-Carnitine. *Pediatric Res* 18: 1325-1328, 1984.
182. Kong JY, Rabbin SW. Palmitate-induced cardiac apoptosis is mediated through CPT-1 but not influenced by glucose and insulin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: 717-725, 2002.
183. Toscani A, Soprano DR, Soprano KJ. Molecular analysis of sodium butyrate-induced growth arrest. *Oncogen Res* 3(3): 223-238, 1988.
184. Maccari F, Arseni A, Chiodi P, Ramacci MT, Angelucci L. Levels of carnitine in brain and other tissues of different stages: effect of acetyl-carnitine administration. *Exp Gerontol* 25: 127-134, 1990.
185. Qureshi IA, Ratnakumari L, Michalak A, Giguère A, Cyr D, Butterworth RF. A profile of cerebral and hepatic carnitine, ammonia and energy metabolism in a model of organic aciduria: BALB/cByJ mouse with short-chain Acyl-CoA deshydrogenase deficiency. *Bioch Med Met Biol* 50: 145-158, 1993.
186. Karlic H, Lohninger S, Koeck T, Lohninger A. Dietary L-carnitine stimulates carnitine acyltransferase in the liver of aged rats. *J Histochem Cytochem* 50: 205-212, 2002.
187. Inverdi C, Tonazzi A, Palmieri F. Characterisation of the unidirectional transport of carnitine catalysed by the reconstituted carnitine carrier from rat liver mitochondria. *Biochem Bioph Acta* 1069: 110-116, 1991.



188. Ramsay RR. The carnitine acyltransferases: modulators of acyl-CoA dependent reactions. *Biochem Soc Trans* 28: 182-186, 2000.
189. Velazquez OC, Jabbar A, Demalteo RP, Rombeau JL. Butyrate inhibits seeding and growth of colorectal metastases to the liver in mice. *Surgery* 120: 440-448, 1996.
190. Cordel S, Heymann MF, Boisteau O, Olivier L, Le Pendu J, Grégoire M, Meflah K. 5-fluorouracil-resistant colonic tumors are highly responsive to sodium butyrate/interleukine-2 bitherapy in rats. *J Cancer* 3: 924-928, 1997.
191. Shack S, Miller A, Liu L, Prasanna P, Thibault A, Samid D. Vulnerability of multidrug-resistant tumor cells to the aromatic fatty acids phenylacetate and phenylbutyrate. *Clin Cancer Res* 2: 825-872, 1996.
192. Cappelini MD, Graziadei G, Ciceri L, Comino A, Bianchi P, Pomati M, Fiorelli G. Butyrate trials. *Ann NY Acad Sci* 850: 110-119, 1998.